

Санкт-Петербургский Государственный университет

Биологический факультет

Кафедра цитологии и гистологии

Баженов Дмитрий Олегович

**Влияние цитокинов на цитотоксическую активность естественных киллеров в
отношении клеток трофобласта**

Выпускная квалификационная работа магистра

Работа выполнена в лаборатории

межклеточных взаимодействий

Института акушерства, гинекологии и репродуктологии им Д.О.Отта

(зав.лаб. - доктор биологических наук, Соколов Д.И.)

Научный руководитель:

доктор биологических наук Соколов Д.И.

Санкт-Петербург

2018

Работа поддержана:

Грантом Президента РФ (НШ-2873.2018.7)

Стипендией Президента РФ (СП-2836.2018.4)

| | | |
|--------|--|----|
| I. | Список сокращений..... | 3 |
| II. | Введение..... | 5 |
| III. | Обзор литературы | 7 |
| 1. | Ключевые вехи в процессе формирования зоны маточно-плацентарного контакта во время беременности..... | 7 |
| 2. | Особенности компонентов иммунной системы в зоне маточно-плацентарного контакта..... | 14 |
| 2.1. | Механизмы иммунологического контроля на разных этапах беременности..... | 14 |
| 2.2. | Особенности клеточного состава в зоне маточно-плацентарного контакта..... | 18 |
| 2.2.1. | Децидуальные макрофаги..... | 18 |
| 2.2.2. | Децидуальные дендритные клетки..... | 20 |
| 2.2.3. | Клетки адаптивной ветви иммунитета..... | 21 |
| 2.2.4. | Особенности цитокиновой сети в зоне маточно-плацентарного контакта..... | 24 |
| 3. | НК-клетки..... | 27 |
| 3.1. | Роль рецепторов в поведении НК-клеток..... | 31 |
| 3.2. | НК-клетки – «прирожденные убийцы»..... | 37 |
| 3.2.1. | Контактный цитоллиз с участием цитотоксических гранул..... | 38 |
| 3.2.2. | Контактный цитоллиз с участием рецепторов «смерти»..... | 40 |
| 3.3. | Дифференцировка НК-клеток, разнообразие субпопуляций и их особенности..... | 41 |
| 3.4. | Вклад НК-клеток в физиологическую беременность..... | 45 |
| 4. | Клетки трофобласта..... | 50 |
| 4.1. | Особенности фенотипа и функции..... | 50 |
| 4.2. | Способы защиты клеток трофобласта от иммунной системы матери, примеры кооперации..... | 51 |
| 4.3. | Цитотоксическая активность НК-клеток в отношении клеток трофобласта..... | 56 |
| IV. | Материалы и методы исследования..... | 59 |
| V. | Результаты исследования..... | 64 |
| VI. | Обсуждение..... | 73 |
| VII. | Выводы..... | 81 |
| VIII. | Приложение..... | 82 |
| IX. | Список литературы..... | 86 |

I. Список сокращений.

ВКМ – внутренняя клеточная масса

БДК – большие децидуальные клетки

МДК – малые децидуальные клетки

ЗДК – зернистые децидуальные клетки

TNF- α - tumor necrosis factor

TGF- β – transforming growth factor beta

CSF-1 – colony stimulating factor 1

GM-CSF - granulocyte-macrophage colony stimulating factor

IFN- γ - interferon- γ

CCL2 - monocyte chemotactic protein-1

CCL19 - macrophage inflammatory protein-3 β

НК-клетки – натуральные киллеры

Дмф – децидуальные макрофаги

ЛПС - липополисахариды

ДД – дендритные клетки

Th – Т-хелперы

Treg – Т-регуляторные

SRR - SLAM-related receptors

KIR - killer cell immunoglobulin-like receptor

LRC - leukocyte receptor complex

NKC - NK receptor complex

KLR - killer cell lectin-like receptors

ITIM - immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif

ITAM - immunoreceptor tyrosine-based activation motif

NCR - natural cytotoxicity receptors

LIR - leukocyte immunoglobulin-like receptors

SAP - SLAM-associated protein

KLRG1 - killer cell lectin-like receptor G1

ЦОМТ – центр организации микротрубочек

TRAIL - TNF-related apoptosis-inducing ligand

ГМПК – гемопоэтические клетки

ВЭВ – вены с высоким эндотелием

NAD – никотинамидадениндинуклеотид

TDO - триптофан 2,3-диоксигеназа

IDO - индоламин-2,3-диоксигеназа

АПК – антигенпрезентирующие клетки

LIF - leukemia inhibitory factor

MCP - membrane complement protein

DAF - decay accelerating factor

II. Введение.

Исследования последних лет в области репродуктивной иммунологии показали, что иммунная система принимает участие на всех этапах беременности (развитие ооцита, преимплантационный период, имплантация, ангиогенез и формирование плаценты). Многие специалисты считают, что в 80% случаев причиной повторных прерываний беременности являются иммунологические. В свою очередь, среди клеток иммунной системы особый интерес представляют натуральные киллеры (NK-клетки). Они отвечают за модификацию спиральных артерий и ангиогенез, определяют глубину инвазии трофобласта. В тканях матки NK-клетки – доминирующая популяция лимфоцитов как в имплантационный период, так и в течение ранней беременности. Уже долгое время предпринимаются попытки разработать метод диагностики, который бы позволил связать патологическое течение беременности и изменения в характеристиках NK-клеток (их количество, цитотоксическая активность, фенотип) [1].

На сегодняшний день принято считать, что цитотоксическая активность NK-клеток во время беременности носит преимущественно негативный характер, равно как и увеличение содержания NK-клеток в периферической крови женщин. Оба этих показателя могут стать причиной для курса лечения, который включает терапию стероидами, блокаторы TNF- α , внутривенные иммуноглобулины. Однако, зачастую лечение не приносит результатов. Это в первую очередь связано с самим методом диагностики функциональной активности NK-клеток, в котором можно отметить ряд серьезных недочетов [2].

Существует несколько общепринятых методов для определения активности NK-клеток. Самый распространенный – оценка цитотоксической активности NK-клеток с помощью клеток мишеней. В качестве мишени выступают клетки линии K-562. Стоит отметить, что такой подход исключает все особенности микроокружения в зоне маточно-плацентарного контакта [3].

Стоит отметить, что не до конца понятна и изучена роль цитотоксической активности NK-клеток при беременности. Недостаточно изучены факторы в зоне маточно-плацентарного контакта, которые влияют на цитотоксическое взаимодействие между NK-клетками и клетками трофобласта. Большинство данных получено в результате сопоставления относительного количества NK-клеток у женщин, их цитотоксической активности и течения беременности. Данный подход содержит целый ряд недочетов:

- Не учитывается субпопуляционный состав NK-клеток

- Не учитываются особенности микроокружения в зоне маточно-плацентарного контакта
- Высокая вариабельность относительного количества NK-клеток в периферической крови (от 5% до 29%)
- Метаанализ строился на основе данных, полученных из разных лабораторий, в которых применялись свои подходы для определения количества NK-клеток и их активности.

Таким образом, общепринятый подход к цитотоксичности NK-клеток во время беременности весьма спорен и неоднозначен. В первую очередь это может негативно сказаться на разработке методов борьбы с привычным невынашиванием, например ВВИГ.

В связи с этим целью нашего исследования явилось изучение особенностей цитотоксической активности NK-клеток в отношении клеток трофобласта во время беременности.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- 1) Изучить особенности цитотоксической активности NK-клеток в отношении клеток трофобласта в присутствии цитокинов.
- 2) Изучить особенности цитотоксической активности NK-клеток в отношении клеток трофобласта в присутствии секреторных продуктов плацент первого и третьего триместров.
- 3) Изучить особенности цитотоксической активности NK-клеток периферической крови в отношении клеток трофобласта во время беременности.

III. Обзор литературы.

1. Ключевые вехи в процессе формирования зоны маточно-плацентарного контакта во время беременности.

После высвобождения из яичника, ооцит направляется в яйцевод с током жидкости, создаваемым ворсинками бахромчатого края воронки яйцевода. В ампулярной части маточной трубы (ближайший к яичнику отдел яйцевода) происходит непосредственно оплодотворение, после чего в уже оплодотворенном яйце завершается мейоз. С момента оплодотворения начинается сложный процесс эмбриогенез. Через 24-30 часов после оплодотворения происходит первое деление дробления. Стоит отметить, что человеческие бластомеры относятся к наиболее медленно дробящимся. Другими особенностями дробления у млекопитающих являются его ротационность и асинхронность. Кроме того, начинают продуцироваться белки, необходимые для дальнейшего развития, уже после первого дробления. На 8-клеточной стадии бластомеры зиготы лежат довольно рыхло. Однако, во время третьего деления дробления они слипаются и формируют плотную сферу, которая стабилизируется за счет плотных контактов снаружи и щелевидных контактов внутри. После четвертого деления дробления образуется 16-клеточный зародыш или морула. На этой стадии ее называют ранней или некомпактной. Она состоит из небольшого количества внутренних клеток и относительно большого количества наружных, которые в большинстве своем станут клетками трофобласта (трофоектодермы). Именно эти клетки в будущем сформируют ткань хориона (зародышевая часть плаценты). Также эти клетки секретируют гормоны, поддерживающие беременность, и регуляторы иммунного ответа. Внутренние клетки формируют внутреннюю клеточную массу (ВКМ), которая даст начало непосредственно зародышу, а также внезародышевым оболочкам: аллантоису, желточному мешку и амниону (Рисунок 1А) [4].

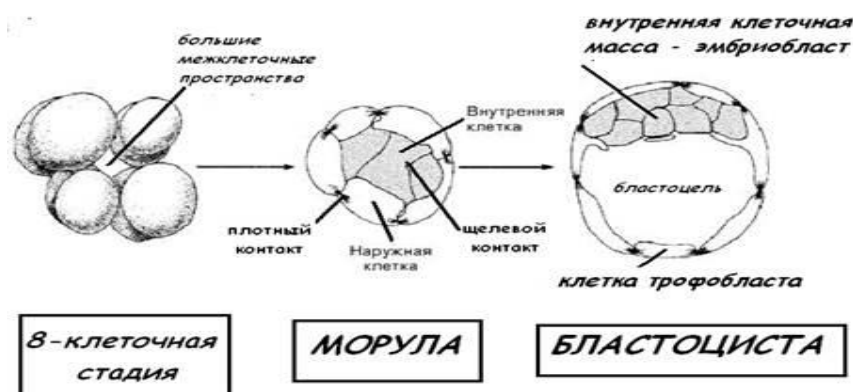


Рисунок 1А. Этапы формирования бластоцисты.

Процесс дробления занимает 4-5 дней, после чего зародыш попадает в матку. Все это время зародыш окружает *zona pellucida* (прозрачная или блестящая оболочка, внеклеточный матрикс яйца). Блестящая оболочка обеспечивает связывания спермия с ооцитом, а затем инициирует акросомную реакцию. После оплодотворения она выполняет защитную функцию. С одной стороны, она защищает организм матери от прогрессивно растущего зародыша, предотвращает его внедрение в маточную трубу, которое повлечет за собой внематочную (или «трубную») беременность. С другой стороны, она защищает зародыш (генетически чужеродный организм) от иммунного конфликта с материнским организмом [4, 5].

После перемещения зародыша в полость матки через блестящую оболочку начинается всасывание маточного секрета, в результате образуется полость, которая называется бластоцель, а зародыш соответственно бластоцистой. Таким образом спустя 6 дней после оплодотворения осуществляется переход из компактной морулы в бластоцисту. В бластоцисте продолжается дифференцировка, заложенная в моруле. Наружные клетки – светлые бластомеры окружают темные бластомеры внутренней клеточной массы. Последние перемещаются в область бластоцисты, получившей название – эмбриобласт. Следующим важным этапом в процессе эмбриогенеза является «вылупление» (*hatching*) зародыша из блестящей оболочки. Это происходит в результате лизиса в ней небольшого отверстия и дальнейшего выскальзывания бластоцисты через него. За это отвечают трипсиноподобная протеаза *trypsin*, локализованная на мембранах клеток трофобласта. В заключении хотелось бы отдельно отметить развитие трофобласта на этом этапе развития. Начав обособляться еще на стадии морулы, клетки трофобласта, а на этом этапе – светлые бластомеры, окружают эмбриобласт и замыкают полость бластоцисты. После этого они приобретают название – первичного трофобласта. Таким образом, по прошествии недели с момента оплодотворения формируется бластоциста, состоящая из клеток внутренней клеточной массы с одной ее стороны, бластоцелью с другой и окружающим их первичным трофобластом [5].

Все последующие этапы, изменения и процессы объединяются в понятие – лакунарная стадия. После растворения блестящей оболочки начинается следующий важный этап – имплантация (нидация). Она включает в себя два последовательных этапа: адгезию и инвазию.

Адгезии цитотрофобласта к клеткам эндометрия с помощью адгезивных молекул (интегрины, фибронекти, ламинин). Бластоциста прикрепляется эмбриональным полюсом к передней или задней стенке матки, ближе к ее дну. В этом месте расположены

децидуальные клетки – особые клетки, формирующиеся из соединительной ткани эндометрия под действием прогестерона, который секретируют лютеоциты. Кроме того, такое расположение обеспечивает правильное расположение плода и частей матки, увеличивает площадь соприкосновения синцитиотрофобласта и слизистой оболочки матки, способствует кровоснабжению. При противоположном прикреплении зародыш погибает [6].

Дальнейшая инвазия осуществляется за счет протеолитических и гидролитических ферментов. Друг за другом лизируются эпителий, собственная пластинка. Стоит отметить, что в разрушении эпителия принимают участие его собственные лизосомы, которые не только обеспечивают внедрение зародыша, но и перестраивают кровеносную систему матери таким образом, чтобы она омывала кровеносную систему плода (Рисунок 1В).

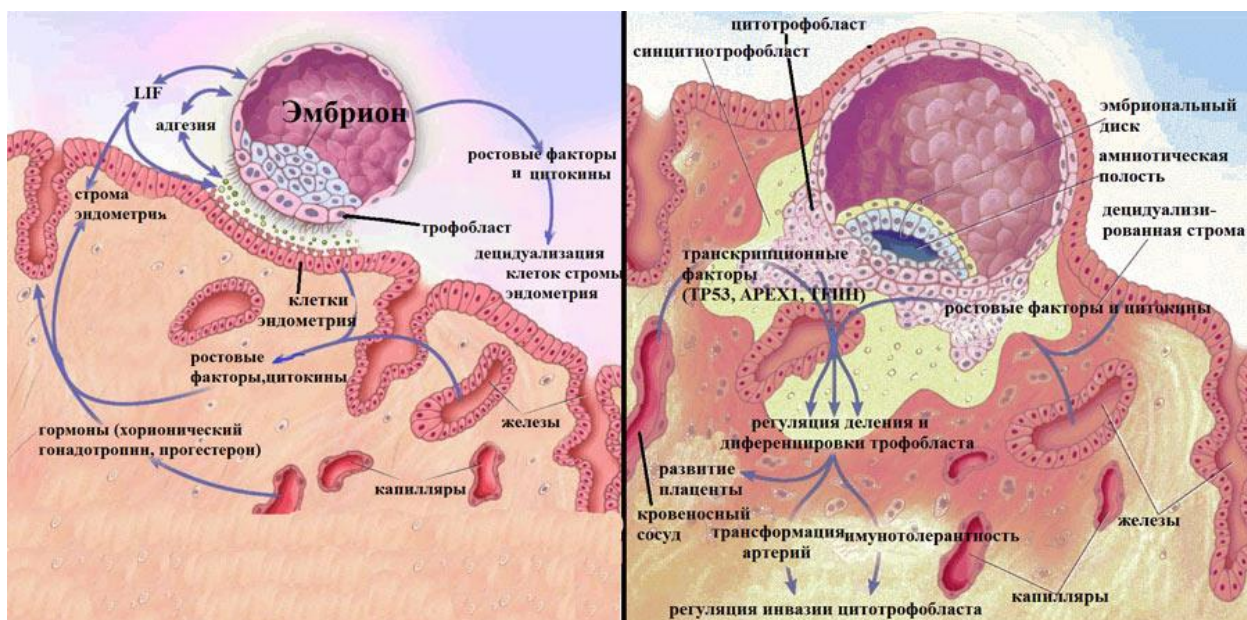


Рисунок 1В. Схема имплантации и инвазии бластоцисты.

Обычно вся имплантация занимает около 40 часов. К этому времени зародыш целиком погружается в слизистую оболочку матери. К 8-9 дню с момента оплодотворения многочисленные углубления в лизированном эндометрии объединяются в сообщающиеся углубления – лакуны. Лакуны – прообраз будущих межворсинчатых пространств. Участки с лизированным и частично деформированным эпителием заделываются смесью из крови, фибрина и частей тканей. Такая структура получила название имплантационный коагулят. Через 12 дней он полностью трансформируется в эпителиальную ткань [5].

Важной вехой на данном этапе является образование протоплазматических выростов из пролиферирующих клеток цитотрофобласта. Эти клеточные тяжи получили название

первичных (хориальных) ворсин, хотя в них еще отсутствуют какие-либо сосуды, а питательные вещества поступают исключительно по законам осмоса и диффузии. Благодаря первичным ворсинам увеличивается расстояние проникновения зародыша. Начиная с момента образования первичных ворсин бластоциста называется плодным пузырем.

Кроме закрепления процесс инвазии выполняет еще одну наиважнейшую функцию – питание зародыша. Во время лакунарной стадии питание зародыша осуществляется именно за счет лизированных тканей матери и носит название – гистиотрофного питания. Со стороны матери в этом принимают участие большие децидуальные клетки. По мере углубления проникновения зародыша гистиотрофное питания сменяется гематотрофным. К этому моменту трофобласт вскрывает эндометриальные капилляры матери, из которых в новообразованные просветы лакун изливается кровь.

Лакунарная стадия подходит к концу на 10-ый день эмбрионального развития.

Одновременно с концом лакунарной стадии начинается этап формирования вторичных ворсин (они же мезенхимальные ворсины). Формирование происходит в результате выселения мезодермальных клеток ВКМ в строму первичных ворсин. Мезенхимальная ворсина представлена двухслойным трофобластом и, выстилающими его изнутри, клетками мезенхимы. Нижний слой клеток образуют клетки цитотрофобласта, они активно делятся, характеризуются высокой митотической активностью. Верхний слой состоит из клеток синцитиотрофобласта. Выселение клеток внезародышевой мезенхимы приходится на 12-13 день эмбрионального развития. Таким образом, к концу второй недели беременности зародыш покрыт первичными и вторичными ворсинами. Совокупность этих ворсин образует хорион (хорион – полноценный внезародышевый орган). В дальнейшем его строение будет усложняться, он соединится со стенкой матки и станет частью плаценты.

Хорион подразделяют на два типа: ворсинчатый хорион или периферический (*chorion frondosum*) и гладкий хорион (*chorion leave*). Именно ворсинчатый хорион формирует хориальную пластинку и ворсины, которые в будущем войдут в состав плодной части плаценты. Так как первостепенная задача ворсинчатого хориона – установление контакта с тканями матери, то и образуется он в месте имплантации. На всей остальной площади ворсины редуцируются (отсюда и название – гладкий хорион), лишь в некоторых местах сохраняются редуцированные ворсины.

В начале третьей недели беременности последовательно происходят два важных процесса. Сначала на 17-19 день трофобласт достигает уровня материнских

эндометриальных артерий, их спиральных сегментов. С их разрушением и вскрытием устанавливается маточно-плацентарное кровообращение. Условно, это событие завершает лакунарную стадию. Затем запускаются два ключевых процесса в формировании плаценты – ангиогенез и васкулогенез. С этого момента на смену лакунарной стадии приходит период плацентации, который продлится вплоть до двенадцатой недели беременности.

Последующие изменения в ворсинах хориона связаны с аллантоисом. За счет этого органа происходит удаление продуктов обмена веществ зародыша. У человека этот орган носит рудиментарный характер, так как эффективность удаления азотистых отходов достигается благодаря материнскому кровообращению. Сосуды аллантоиса растут навстречу формирующимся капиллярам в составе мезенхимальных ворсин. Примерно на 4-5 неделю происходит воссоединение этих структур, устанавливается полноценное фетоплацентарное кровообращение. Вторичные ворсины с формировавшимися капиллярами, в состав которых вошли сосуды аллантоиса, приобретают статус третичных ворсин.

Третичная ворсина – праматерь всех последующих генераций ворсин хориона. Во время первого триместра эти ворсинки последовательно проходят следующие стадии дифференцировки: незрелые промежуточные, стволовые ворсинки. На поверхности мезенхимальных и незрелых ворсин формируются специальные образования – трофобластические почки. Они дают начало новым генерациям отростков и ветвей ворсин, которые продолжают делиться (преимущественно дихотомически).

К концу третьей недели, в начале четвертой при физиологически протекающей беременности должны быть подведены следующие итоги:

- наличие кровеносных сосудов в большинстве ворсинок.
- сформировано ворсинчатое дерево, точнее его фундамент, состоящий из стволовых ворсин (крупных опорных, сосудистая сеть которых включает как плодовые артерии и вены, так и капилляры), промежуточных ворсин, мезенхимальных ворсин.
- Клетки мезенхимы в строме ворсинок продолжают дифференцироваться, в результате чего образуются ретикулярные волокна, фибробластические клетки и клетки Кащенко-Гофбауэра (плацентарные макрофаги).

Четвертая неделя беременности связана с притоком материнской крови к плаценте за счет работы вневорсинчатого трофобласта. Благодаря специальным ворсинам (якорные ворсины) трофобласт закрепляется на эндометрии. Клетки трофобласта, расположенные островками, пролиферируют и вырабатывают ферменты. Все это приводит к разрушению тканей эндометрия. Итогом этой активности становится вскрытие спиральных артерий эндометрия, устанавливается маточно-плацентарный кровоток. Процесс проходит в два этапа: с 6-ой по 8-ую неделю и с 8-ой по 12-ую неделю.

После четвертой недели беременности происходит замещение цитотрофобласта на синцитиотрофобласт. Обмен питательными веществами и гормонами между клетками цитотрофобласта и средой происходит благодаря субмикроскопическим пространствам между синцитием и клеточным трофобластом. На момент 6-ой недели беременности синцитиотрофобласт должен занимать 2/3 эпителиального пласта ворсинок.

К концу второго месяца беременности завершается еще один важный процесс – децидуализации (изменения в тканях эндометрия, которые начались еще на 21-ый день овариально-менструального цикла). Изменения эндометрия при децидуализации неоднородны и зависят от своего расположения. Всего в эндометрии принято выделять два слоя: компактный (обращен в просвет полости матки) и губчатый (спонгиозный, прилегает к миометрию).

Логично, что трансформация сильнее выражена в компактном слое, непосредственно контактирующем с трофобластом. В нем отмечают уменьшение желез и их просвета. В спонгиозном слое напротив становятся больше, формируют специальные сосочковые выросты. Эти железы получили название желез беременности Опитца. Соединительная ткань спонгиозного слоя, расположенная между железами Опитца, слабо подвергается децидуальной трансформации. Образование новых децидуальных клеток в основном происходит благодаря митотическим делениям новообразованных децидуальных клеток.

По завершении децидуализации в эндометрии выделяют три типа клеток: большие (БДК), малые (МДК) и зернистые (ЗДК) децидуальные клетки.

МДК – являются малодифференцированными предшественниками, которые дают начало остальным клеточным субпопуляциям.

БДК – обладают хорошо развитым аппаратом Гольджи и эндоплазматической сетью. В них детектируется большое количество пузырьков, включений.

Электронномикроскопически показаны процессы экзоцитоза (мерокриновым способом). БДК выполняют трофическую функцию. Именно они осуществляют синтез и депонирование питательных веществ, предназначенных для питания зародыша во время гистиотрофной фазы.

В децидуальной оболочке принято выделять три части. Базальная часть расположена в зоне имплантации, из нее формируется материнская часть плаценты. Со стороны просвета матки находится капсулярная часть, напротив нее находится париентальная децидуальная оболочка. В начале второго триместра капсулярная и париентальная части сливаются в одну.

Во время 8-ой недели беременности строение ворсинок оформляется в структурную единицу плаценты – котиледон. В состав котиледона входят: хориальная пластинка, стволовая ворсина и ее ответвления. По завершении периода плацентации в плаценте должно насчитываться 200 котиледонов. На этом заканчивается период плацентации, а вместе с ним и первый триместр беременности (Рисунок 1С).

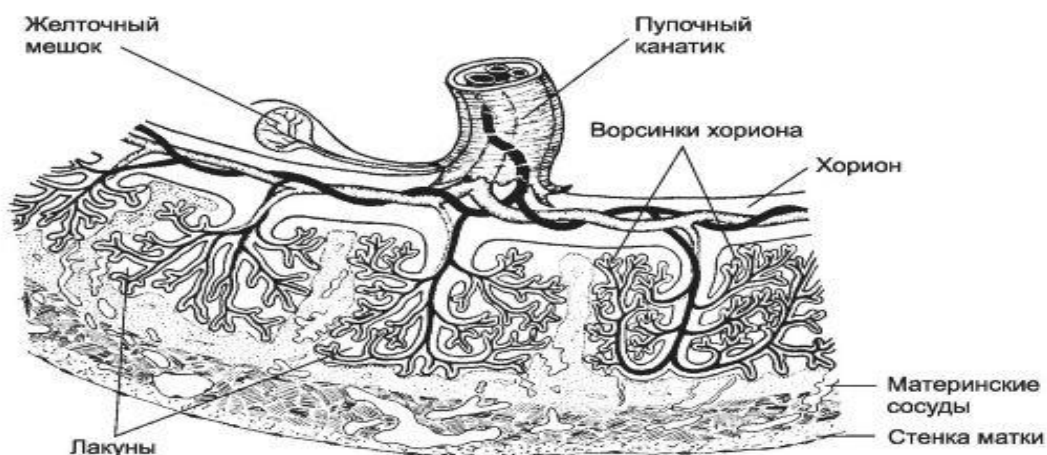


Рисунок 1С. Схема строения плаценты.

В течение всего второго триместра происходит процесс фетализации. Ворсинчатое дерево растет и усложняется. За счет внедрения вневорсинчатого трофобласта происходит вторая волна внедрения в эндометрий, что приводит к приросту маточно-плацентарного кровотока. Период фетализации продлится до 35-ой недели беременности (11-ая неделя третьего триместра). После чего начнется период зрелой плаценты. На этой стадии строение ворсинчатого дерева плаценты меняется в соответствии с метаболическими потребностями растущего плода [5, 6].

Таким образом, беременность – сложный многоэтапный процесс. Одним из ключевых этапов является формирование зоны маточно-плацентарного контакта. Данный процесс требует коллаборации клеток плода и матери.

2. Особенности компонентов иммунной системы в зоне маточно-плацентарного контакта.

Как было сказано выше, формирование зоны маточно-плацентарного контакта во многом зависит от клеток матери. Значительный вклад в этот процесс вносят именно клетки иммунной системы. Стоит отметить, что их роль прослеживается и на самых ранних этапах беременности, начиная с момента оплодотворения.

2.1. Механизмы иммунологического контроля на разных этапах беременности.

Беременность представляет особый интерес с точки зрения иммунологии. Система, задача которой идентифицировать и элиминировать генетически чужеродные вещества, не только игнорирует, но и способствует развитию в организме матери семиаллогенного плода.

Первые концепции предполагали, что иммунная система матери приобретает подавленный статус, чем обусловлено отсутствие иммунного ответа [7]. Однако, важно помнить, что зачастую причиной выкидышей и преждевременных родов являются именно инфекционные заболевания (как бактериального, так и вирусного характера). Поэтому, если иммунная система матери действительно начнет функционировать не в полную силу, то шанс удачной беременности снизится еще больше.

Сегодня главенствует интегральная модель, согласно которой иммунная система модифицируется. Изменениям подвергаются как врожденная, так и приобретенная ветви иммунной системы [8].

Перестройки в иммунной системе женщины начинаются до зачатия и имплантации бластоцисты. Так во время овариально-менструального цикла происходят изменения, направленные на ремоделирование тканей матки, на случай успешного оплодотворения:

- В раннюю пролиферативную фазу эстрадиол стимулирует пролиферацию и дифференцировку эндометриальных эпителиальных клеток.
- В момент овуляции эстроген уже инициирует изменения мезенхимальных клеток эндометрия.

В свою очередь, модифицированные, в результате действия гормонов, эндометриальные клетки продуцируют цитокины, в первую очередь провоспалительные

(TNF- α , IL-6, TGF- β 1) и ростовые факторы (CSF-1, GM-CSF), влияющие на лейкоциты периферической крови женщины [9]. Эстроген и прогестерон регулируют синтез цитокинов эпителиальными клетками матки. Так эстроген стимулирует синтез провоспалительных цитокинов: GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor), TNF (tumor necrosis factor), концентрации всех этих цитокинов возрастают в пролиферативной фазе [10]. В присутствии эстрогена увеличивается концентрация IFN- γ (interferon- γ) [11]. Прогестерон может напрямую связываться с клетками иммунной системы через глюкокортикоидный рецептор. В результате в них снижается выработка провоспалительных цитокинов IL-1, GM-CSF [12].

Кроме опосредованного эффекта через другие клетки, гормоны могут воздействовать на клетки иммунной системы напрямую, так прогестерон ингибирует продукцию оксида азота макрофагами [12]. На мышинных моделях было показано, что эстроген стимулирует приток макрофагов и других лейкоцитов в матку [13]. Прогестерон у женщин обеспечивает жизнеспособность и пролиферацию NK-клеток [14, 15].

С течением времени, изменения лейкоцитов периферической крови приводят к началу формирования уникального клеточного микроокружения в зоне будущего маточно-плацентарного контакта. В матке повышается содержание Т-регуляторных лимфоцитов, которые отвечают за снижение воспалительной реакции, способствуют иммунологической толерантности. Во многом поддержание и увеличение данной клеточной популяции обеспечивает прогестерон, особенно во время лютеиновой фазы, когда возрастает его уровень [16]. Дендритные клетки и макрофаги широко распространены в строме эндометрия, еще больше их в миометрии. Там же содержатся NK-клетки с уникальным фенотипом, характерным только для NK-клеток матки.

В свою очередь хемокины не только рекрутируют клетки иммунной системы в зону маточно-плацентарного контакта по градиенту концентрации, но и обеспечивают их трансмиграцию через эндотелиальные клетки [17, 18]. Выделяют по меньшей мере девять ключевых хемокинов, которые определяют, где и в какое время в эндометрии появятся лейкоциты той или иной популяции. Так в течение окна имплантации (период второй фазы менструального цикла, когда в эндометрии формируются наиболее благоприятные условия для прикрепления эмбриона) прогестерон усиливает экспрессию таких хемоаттрактантов как: IL-8 и CCL2 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1), также он увеличивает концентрации хемокинов, предназначенных для маточных NK-клеток: CXCL10 (IP10), CXCL11 (ITAC) [18, 19]. В рекрутировании Т-регуляторных лимфоцитов принимают участие CCL19 (macrophage inflammatory protein-3 β , MIP3 β) и CCL5 (RANTES) [20].

После выхода яйцеклетки из фолликула, она попадает в более агрессивную среду. Так если в фолликул не могут проникнуть клетки иммунной системы, то в яичнике в избытке присутствуют макрофаги. Макрофаги яичников участвуют в фолликулогенезе, отвечают за формирование и утилизацию желтого тела. Они секретируют проангиогенные факторы, которые в свою очередь способствуют синтезу прогестерона [21]. Хотя в норме ооцит не вызывает иммунного ответа со стороны организма матери. Существует ряд аутоиммунных заболеваний, при которых начинается отторжение. Ряд экспериментов показывал, что в таких случаях иммунный ответ подавляется с помощью Т-регуляторных лимфоцитов [22]. Кроме того, ооциты преимущественно несут на своей поверхности молекулы HLA-G, которые в отличие от молекул HLA-A, HLA-B, HLA-C характеризуются низкой иммуногенностью [23]. Ооцит также может секретировать некоторые изоформы HLA-G (HLA-G1, HLA-G5), которые оказывают иммуносупрессирующий эффект [24].

Следующий этап беременности, во многом зависящий от иммунной системы, наступает непосредственно после оплодотворения. Семенная жидкость содержит большое количество чужеродных антигенов, которые должны формировать у матери антиспермальную иммунную реакцию. Однако, согласно исследованиям, вещества, содержащиеся в семенной жидкости, не только защищают ее от иммунной системы, но и запускают процессы, способствующие успешной беременности. Так в составе спермы обнаружены иммуносупрессирующие молекулы HLA-G5, которые также несут лейкоциты и эпителиальные клетки генитального тракта, которые также входят в состав семени [25]. Молекулы HLA-G5 подавляют цитотоксическую активность Т-лимфоцитов, NK-клеток и индуцируют формирование пула регуляторных Т-клеток с фенотипом $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$ [26]. Также в состав семени входят цитокины, которые действуют на клетки эндометрия. Например, TGF- β , который синтезируется в неактивной форме, а активируется уже в женском половом тракте [27]. Активный TGF- β , простагландины-E запускают воспалительную реакцию, в результате которой возрастают концентрации хемокинов и цитокинов (CSF2, IL-6, IL-8, IL-1A) [28-30]. Все это приводит к инфильтрации в стромальные ткани матки клеток иммунной системы: макрофагов, гранулоцитов, дендритных клеток, Т-регуляторных лимфоцитов. Макрофаги и гранулоциты элиминируют патогены и дебрис [31]. Отцовские антигены в составе спермы активируют Т-регуляторные лимфоциты, которые позже мигрируют в децидуальную ткань и формируют пул клеток, задача которых обеспечить толерантность по отношению к полуаллогенному плоду [32].

Иммунная система также принимает участие в миграции ооцита к ампулярной части маточной трубы, а затем направляет оплодотворенную яйцеклетку к месту имплантации.

Зародыш на стадии бластоцисты – потенциальная мишень для иммунной системы матери, так как экспрессирует отцовские аллогенные антигены. Принято считать, что блестящая оболочка вместе с гранулезными клетками полностью защищают зародыш от лимфоцитов матери, однако смысл в этой защите появляется только в том случае, если наружные клетки трофобласта начнут экспрессировать молекулы HLA-A, HLA-B, HLA-C [25]. Кроме того, на зародыш оказывают влияние цитокины и хемокины, которые секретируют эпителиальные клетки маточной трубы. Было показано, что GM-CSF, CSF-1, LIF способствуют развитию бластоцисты, в то время как TNF и IFN- γ оказывают ингибирующий эффект [33]. Более того, несмотря на протективное действие блестящей оболочки, существуют дополнительные механизмы защиты. Ооцит секретирует некоторые изоформы HLA-G. Хорионический гонадотропин, который начинает секретироваться непосредственно перед имплантацией, связывается с рецепторами децидуальных макрофагов, способствует формированию пула толерогенных децидуальных клеток [34].

Имплантация эмбриона – пожалуй один из самых важных этапов. К этому времени часть клеток эндометрия под действием прогестерона становятся децидуальными клетками (это происходит во второй половине менструального цикла). В этой перестройке принимают участие гормоны, ростовые факторы, цитокины, дендритные клетки и NK-клетки. Изменения в эндометрии запускают миграцию лимфоцитов из периферической крови, их адгезию, дифференциацию и пролиферацию в зоне имплантации. В результате этих процессов кардинально меняется клеточное микроокружение в месте имплантации эмбриона [35]. Изначально в слизистых тканях матки преобладают антиген-специфичные лимфоциты. К моменту имплантации Т-лимфоциты и В-лимфоциты покидают место будущего маточно-плацентарного контакта, а им на смену приходят Т-регуляторные клетки. Также показано, что содержание Th2-лимфоцитов в месте имплантации эмбриона соответствует таковому в периферической крови. Однако, отмечено снижение количества клеток Th1 и Th17 [36]. Таким образом, матка в период беременности становится местом, где преобладают противовоспалительные факторы, тем самым организм предпочитает защите и развитию плода. В виду этих изменений иммунная система в месте маточно-плацентарного контакта хуже справляется с патогенами, в результате чего инфекции зачастую приводят к преждевременным родам.

Таким образом, иммунная система матери вовлечена в развитие беременности еще с момента начала овариально-менструального цикла. Участвует в оплодотворении и имплантации. А главное, все это время формирует нужное клеточное микроокружение, с

которым в течение всей дальнейшей беременности предстоит взаимодействовать клеткам плода.

2.2. Особенности клеточного состава в зоне маточно-плацентарного контакта.

Клетки в зоне маточно-плацентарного контакта приобретают характерные фенотипические особенности, меняют свой цитокиновый профиль, что в свою очередь приводит к изменению их функций. Все эти различия позволили выделить клетки иммунной системы в зоне маточно-плацентарного контакта в отдельные субпопуляции, отличающиеся от клеток периферической крови. Многие клетки в зоне маточно-плацентарного контакта приобрели приставку «децидуальные» (Рисунок 2).

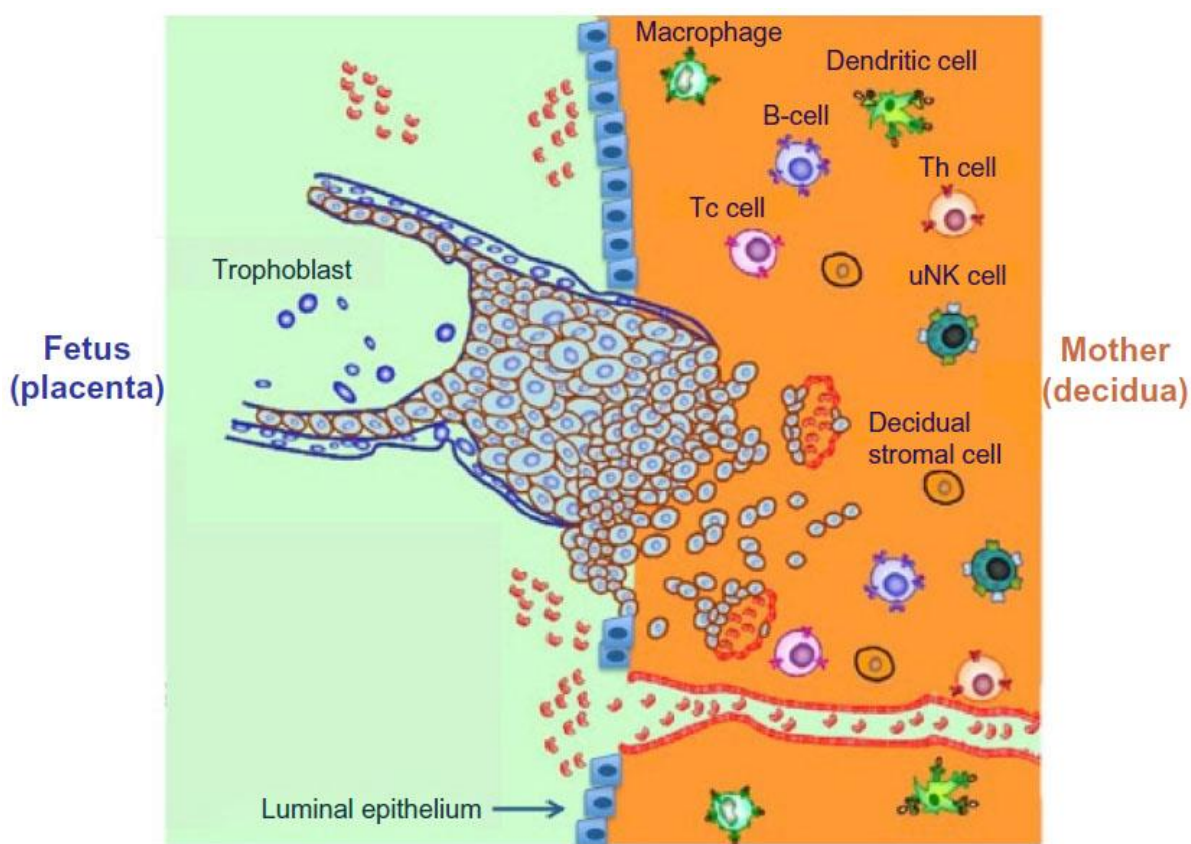


Рисунок 2. Клеточный состав в зоне маточно-плацентарного контакта. (Взято из «The maternal immune system during pregnancy and its influence on fetal development»)

2.2.1. Децидуальные макрофаги.

В зоне маточно-плацентарного контакта децидуальные макрофаги (ДМф) стоят на втором месте по численности после НК-клеток (15-20% от числа всех децидуальных стромальных клеток). Количество ДМф возрастает в первом I триместре и остается стабильным во II триместре, во время родовой деятельности их количество снова растет [37]. В число их функций входит защита от патогенов, ремоделирование тканей,

поддержание гомеостаза, иммунномодулирование. ДМф человека могут презентировать антигены Т-лимфоцитам. Так они экспрессируют HLA-DR, CD11c, CD86 [38].

По своим свойствам ДМф напоминают альтернативно активированные макрофаги (M2). Для них характерна продукция IL-10 и TGF- β 1. Также ДМф несут на своей поверхности молекулы B7-H1. Полагают, что существует несколько источников ДМф. Макрофаги могут мигрировать из периферической крови в ответ на действие хемокинов (CCL2, CCL3, CCL5, CXCL16, M-CSF). В качестве источников этих хемокинов выступают NK-клетки, клетки трофобласта, клетки плодной оболочки. Увеличение количества макрофагов коррелирует с увеличением в децидуальной оболочке CCL2 и CCL3 [39].

Для клеток моноцитарно-макрофагального ряда характерна высокая степень дифференцировки и специализации, которые зависят от их месторасположения в организме и особенностей микроокружения. Макрофаги принято делить на две субпопуляции в зависимости от пути их активации. Выделяют классический путь активации (M1), когда в качестве индукторов выступают IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, комбинация IFN- γ и липополисахаридов (ЛПС). Такие макрофаги приобретают фенотип CD14^{low}/CD163^{low}/CD206^{high}/CD209^{low}. Второй путь активации – альтернативный (M2). В этом случае в качестве индукторов их дифференцировки выступают IL-10, IL-21, IL-33, TGF- β иммунные комплексы. Макрофаги, активированные по альтернативному пути, приобретают фенотип CD14^{low}/CD163^{low}/CD206^{high}/CD209^{high}. Кроме фенотипа между M1 и M2 макрофагами существует еще ряд различий. M1 макрофаги продуцируют провоспалительные цитокины (IL-1 β , TNF- α , IL-6), принимают участие в Th-1 опосредованном иммунном ответе. M2 макрофаги также продуцируют провоспалительные цитокины (TNF- α , IL-6), характеризуются повышенной экспрессией различных рецепторов (scavenger-рецепторов, маннозных рецепторов, galactose-type-рецепторов), принимают участие в репарации и ремоделировании тканей, регулируют ангиогенез и лимфангиогенез (продуцируют IL-8, VEGF-A, VEGF-C, EGF), обеспечивают ветвление сосудов. В отличие от M1 макрофагов M2 макрофаги активируют Th-2-опосредованный иммунитет [40-42].

Анализ ДМф показал, что по своим свойствам (спектр цитокинов, фенотип) они больше соответствуют M2 макрофагам. Однако, более подробный анализ позволяет выделить их в отдельную субпопуляцию. В свою очередь ДМф также можно подразделить на две субпопуляции: мажорную – CD14⁺/HLA-DR⁺/CD11c^{high} (75%, отличаются более выраженными антигенпрезентирующими свойствами) и минорную – CD14⁺/HLA-DR⁺/CD11c^{low} (25%). Более того, есть данные о наличии у ДМф трансдифференцировки.

Например, ДМф I триместра в присутствии IL-4 и GM-CSF приобретают фенотип CD14/CD25⁺/CD83⁺, этот процесс может блокировать IL-10 [43, 44].

Как и остальные клетки иммунной системы, при беременности, ДМф должны осуществлять две взаимоисключающие функции. С одной стороны, они должны защищать организм от патогенов, чужеродных антигенов. С другой стороны, оберегать полуаллогенный плод. Невыполнение первой задачи, равно как и второй, приводит к спонтанным абортам и преждевременным родам. Примером иммуносупрессивных свойств ДМф может служить продукция ими IL-10, который в свою очередь подавляет продукцию противовоспалительных цитокинов Т-лимфоцитами, снижает экспрессию молекул МНС II класса [45]. ДМф также участвуют в пролиферации, активации и дифференцировке дNK-клеток, благодаря продукции IL-15, снижают их цитотоксическую активность [45, 46]. Предполагают, что свои иммуносупрессивные функции ДМф приобретают в результате связывания с молекулами локуса HLA-G, расположенными на клетках трофобласта, а также находящимися в свободной форме, через свои рецепторы ILT-2 и ILT-4. ДМф наряду с клетками экстравиллезного трофобласта экспрессируют рецептор B7-H1 (CD274). Этот рецептор выступает в качестве лиганда к рецептору CD279, который расположен на Т-лимфоцитах и вовлечен в негативную регуляцию иммунного ответа. Он ингибирует TCR-опосредованную активацию. В экспериментах *in vivo* было показано, что Treg смещают дифференцировку макрофагов в сторону M2 фенотипа, стимулируют продукцию ими IL-10 [43]. ДМф контролируют ангиогенез через продукцию MMP-7 и MMP-9. Вместе с NK-клетками ДМф индуцируют апоптоз гладкомышечных клеток и эндотелиальных сосудов, подготавливая почву для инвазии трофобласта. ДМф также обеспечивают сдерживание трофобласта во время его инвазии, контролируют ремоделирование сосудов матки [47].

Особенно хотелось бы отметить взаимодействие ДМф и uNK-клеток. Есть данные, что эти две клеточные популяции могут активировать друг друга, что приводит к неспецифическому иммунному ответу, как следствие к раннему выкидышу. Активация uNK-клеток происходит через секретируемые макрофагами цитокины TNF- α и IL-12, которые стимулируют продукцию IFN- γ NK-клетками, последний в свою очередь усиливает выработку TNF- α и IL-12 в макрофагах [48].

2.2.2. Децидуальные дендритные клетки.

Дендритные клетки в зоне маточно-плацентарного контакта малочислены по сравнению с NK-клетками и макрофагами. Однако, даже среди них выделяют

субпопуляции. Так ряд ДДк (децидуальные дендритные клетки) несет CD83, другие характеризуются наличием CD14 [49]. Особый интерес представляют неоднозначные взаимодействия между ДДк и NK-клетками. Так в эксперименте *in vivo* было показано, что ДДк способствуют пролиферации NK-клеток. Кроме того, ДДк увеличивают количество uNK-клеток [50]. Среди ДДк выделяют особую субпопуляцию – DC-SIGN⁺CD14⁺CD83⁻. Эти клетки не могут стимулировать покоящиеся Т клетки. Однако в присутствии провоспалительных цитокинов трансформируются в зрелые ДДк, которые активируют Treg [51].

ДДк подразделяются на две категории: CD83⁺ зрелые (примерно 1%) и CD83⁺ незрелые. ДДк из первой группы проявляют толерогенные свойства. Они контролируют активацию и экспансию Treg клеток, среди их фенотипических особенностей выделяют экспрессию костимулирующих молекул (CD80 и CD86), отсутствие продукции IL-12 (индуктора Th1-лимфоцитов). ДДк секретируют ИДО, что позволяет им напрямую активировать покоящиеся Treg клетки, способствуя их переходу к фенотипу CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ [52, 53].

Формированию пула толерогенных дендритных клеток в зоне маточно-плацентарного контакта способствуют еще несколько факторов. Например, децидуальные цитокины: TGF-β, IL-10, GM-CSF, G-CSF, IL-4, молекула HLA-G в зоне фето-плацентарного микроокружения приводят к толеризации ДДк, которые в свою очередь формируют анергичные CD4⁺ и CD8⁺ лимфоциты. uNK также способствуют формированию данного пула клеток [54, 55].

2.2.3. Клетки адаптивной ветви иммунитета.

Главные клетки-эффекторы приобретенного иммунитета: Т-лимфоциты и В-лимфоциты. Т-лимфоциты традиционно делят на две главных субпопуляции: цитотоксические (CD8⁺) и хелперы (CD4⁺, Th клетки). Среди Т-хелперов в свою очередь выделяют:

Th1-клетки – продуцируют провоспалительные цитокины.

Th2-клетки – продуцируют противовоспалительные цитокины, обеспечивают развитие В-лимфоцитов.

Th17-клетки – продуцируют провоспалительные цитокины, участвуют в элиминации патогенов, отторжении трансплантатов.

Th9-клетки – продуцируют IL-9, участвуют в противоопухолевом иммунитете, аллергическом воспалении.

Treg-клетки – выступают в качестве иммуносупрессоров.

Th22-клетки – продуцируют IL-22

Tfh-клетки – ответственны за индукцию В-лимфоцитов, формирование герминативного центра фолликула, формирование пула В-клеток памяти

Первые две субпопуляции изучены лучше, в то время как Th-17 и Treg-клетки описаны хуже. Что еще важнее, эти клетки куда пластичнее, их фенотип сильно зависит от микроокружения [56-58].

Во время беременности количество Т-лимфоцитов, специфичных к чужеродным МНС, велико. Однако, те из них, что запрограммированы на убийство клеток, несущих отцовские МНС, элиминируются из дицидуальных тканей. Было несколько теорий, которые объясняли данный феномен. Долгое время главенствовала теория, согласно которой при беременности устанавливается доминирование Th2-клеток над Th1-клетками. Такой перевес достигается благодаря ряду факторов. Например, клетки врожденного иммунитета в зоне маточно-плацентарного контакта продуцируют цитокины Th2-типа, сами клетки плаценты через взаимодействие с ДДк и ДМф могут модифицировать фенотип Т-клеток. Позже эта теория получила ряд дополнений. Стало понятно, что цитокины Th1-типа (IFN- γ , TNF- α) не всегда связаны с патологией, а наоборот обеспечивают поддержание гомеостаза в плаценте. Сегодня превалирует мнение, согласно которому Th1 и Th17-клетки не элиминируются, но подавляются действием ряда факторов (TGF- β , IL-10, прогестерон, простагландины, Treg-клетки). Th2-клетки и В-лимфоциты наоборот поддерживает ряд белков, секретируемых плацентой и снижающих гибель этих клеток (BAFF, APRIL). Именно подавленное, а не элиминированное состояние Th1-клеток доказывается мощным Th1-клеточным иммунным ответом при заражении матери патогеном. И хотя такая реакция может спасти жизнь матери, для плода она несет разрушительный характер [59, 60].

Доля Т-лимфоцитов в зоне маточно-плацентарного контакта в начале беременности составляет около 10%. Большая часть клеток при этом обладает CD8⁺ фенотипом. Многие из этих клеток несут γ/δ Т-клеточный рецептор. Также во время беременности в периферической крови у каждой второй женщины обнаруживают Т-клетки специфичные к

HLA молекулам плода. Аналогичная ситуация наблюдалась и в экспериментах на мышах. Более того, в парах, где самцы и самки сильно отличались гетерогенностью МНС-генов потомство, было здоровей, особенно в сравнении с инбредными парами [61-63].

Treg-клетки – наиболее функционально значимая популяция Т-лимфоцитов в зоне маточно-плацентарного контакта. Эти клетки обладают фенотипом $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ и предотвращают развитие иммунной реакции клеточного типа, блокируют иммунный ответ как на собственные антигены, так и на чужеродные [64, 65]. Изначально полагали, что Treg-клетки подавляют пролиферацию и активацию исключительно у $CD4^+$ Т-клеток. Позже было показано, что они также влияют на $CD8^+$ Т-клетки, подавляют пролиферацию В-клеток, равно как и продукцию ими иммуноглобулинов, ингибируют цитотоксическую активность NK-клеток (экспериментально показано снижение экспрессии на NK-клетках NKG2D), ингибируют антиген-презентирующую и провоспалительную активность макрофагов и дендритных клеток. Таким образом, Treg-клетки могут контролировать клетки как врожденного, так и приобретенного иммунитета [66-68].

Treg клетки принято классифицировать на основе их происхождения на две группы: естественные (развиваются в тимусе) и адаптивные, Tr1-клетки (развиваются на периферии). При беременности особый интерес представляют именно Tr1-клетки. С помощью Т-клеточного рецептора они распознают антигены характерные для определенных тканей на периферии, но не представленные в тимусе. К таким антигенам можно отнести те, что несет зародыш, сперма, ооцит [65].

Дифференцировка Treg-клеток происходит после контакта с антигеном, который им презентует дендритная клетка. Также в Treg-клетки могут дифференцироваться наивные Th0 клетки в присутствии TGF- β . После активации Treg клетки начинают самостоятельно продуцировать TGF- β , IL-10 [69].

Благодаря своей иммуносупрессивной активности именно Treg-клетки во многом обеспечивают толерантность к аллоантигенам плода. В экспериментах на мышах, в которых удаляли Treg-клетки происходило отторжение плода. Однако, в случае сингенного плода отторжения не было. У женщин Treg-клетки составляют 14% от всех $CD4^+$ клеток. Децидуальные Treg-клетки экспрессируют CTLA-4, GITR, OX40, как и Treg-клетки других тканей. Одним из способов пополнения пула децидуальных Treg-клеток может быть их миграция из периферической крови. В этом принимает участие хемокин CCL19, который через CCR7 рецептор привлекает Treg клетки. За продукцию CCL19 отвечают эпителиальные клетки. Считается, что через CCR5 рецептор Treg клетки добираются до

места имплантации. В пользу этого говорит увеличение количества $CD4^+CD25^+$ клеток в периферической крови. Количество и иммуносупрессивная активность этих клеток коррелирует со степенью разнородности молекул HLA-C у матери и плода. Изменения в популяции Трег-клеток начинаются с первых дней беременности. Модели *in vitro* показали, что в присутствии прогестерона происходит трансформация $CD4^+CD25^-$ в $CD4^+CD25^+$ [32, 64, 70].

Суммируя все вышесказанное, хочется еще раз отметить, что в зоне маточно-плацентарного контакта формируется уникальное клеточное микроокружение, в первую очередь состоящее из клеток иммунной системы матери. Более того, их уникальные свойства позволяют говорить о плаценте, как об уникальном, временном органе иммунной системы. Однако, до сих пор остается много неясного в вопросах коммуникации и взаимодействия этих клеточных субпопуляций между собой. Во многом эти взаимодействия основываются на, продуцируемых этими клетками, цитокинах. В свою очередь, цитокиновая сеть в зоне фетоплацентарного контакта ставит перед исследователем еще больше вопросов.

2.2.4. Особенности цитокиновой сети в зоне маточно-плацентарного контакта.

Цитокины – белковые молекулы, продуцируемые различными клетками организма и осуществляющие межклеточные и межсистемные взаимодействия. Существует ряд классификаций цитокинов, которые учитывают их строение, функциональную активность. Традиционно принято выделять следующие группы цитокинов:

- 1) Интерлейкины (IL-1 – IL-27) – регуляторные белки иммунной системы. Обеспечивают медиаторное взаимодействие в иммунной системе и связь ее с другими системами организма.
- 2) Интерфероны – выступают в качестве противовирусных агентов с выраженным иммунорегуляторным действием (IFN 1-ого типа: α , β , δ , κ , τ , ω , IFN 2-ого типа – IFN- γ ; интерфероноподобные цитокины: IL-28A, IL-28B, IL-29).
- 3) Факторы некроза опухоли – цитокины с цитотоксическим и регуляторным действиями: TNF- α , лимфотоксин.
- 4) Хемокины – регуляторы хемотаксиса (CC, CXC, CX3C, C).
- 5) Гемопоэтины – факторы роста стволовых клеток, IL-3, IL-7, IL-11, эритропоэтин, тромбопоэтин, GM-CSF, G-CSF, M-CSF.
- 6) Факторы роста – регуляторы роста, дифференцировки и функциональной активности клеток различной тканевой принадлежности (фактор роста

фибробластов, сосудисто-эндотелиальный фактор роста, фактор роста эпидермиса). [71]

В зоне маточно-плацентарного контакта характеризуется чрезвычайно разветвлённой цитокиновой сетью. Однако, особый интерес представляют следующие цитокины: IL-15, IL-18, IL-10

IL-15 состоит из четырех α -цепей. Выступает в качестве ростового фактора для Т-клеток и NK-клеток. Во многом его функции перекрываются с функциями IL-2. Однако, есть ряд различий. Так, например, IL-15 широко представлен в тканях всего организма, в том числе и в плаценте, в то время как, IL-2 продуцируют только активированные Т-клетки и ДК. Также было показано, что IL-15 вносит большой вклад в развитие dNK-клеток [72, 73]. Рецептор к IL-15 – гетеротример. Специфичность данного рецептора обеспечивает α -субъединица (IL-15R α). Также в его состав входит β -субъединица (IL-15R β , IL-2R, CD122), аналогичная рецептору к IL-2. Последняя, γ -субъединица (CD132) аналогична для рецепторов к IL-4, IL-7, IL-9, IL-21 [74, 75]. Стоит отметить, что IL-15R β несут на своей поверхности NK-клетки. Конкретно для dNK-клеток была показана экспрессия β и γ субъединиц, а на очищенный CD56⁺ dNK-клетках найдена экспрессия α -субъединицы. В начале беременности IL-15 секретируется децидуальными клетками спиральных артерий. Главный индуктор экспрессии мРНК данного цитокина – прогестерон. В течение менструального цикла концентрация IL-15 достигает своего пика в поздней секреторной фазе. В ряде случаев, когда уровень прогестерона во время беременности падал, первым признаком служила гибель NK-клеток. Это могло быть вызвано низким уровнем IL-15 [76, 77]. Уровень этого цитокина также снижен у женщин с эндометриозом. В качестве одного из негативных регуляторов IL-15 выступает IL-1 β [78].

До сих пор нет четкой классификации IL-15. Чаще всего его относят к провоспалительным цитокинам I типа [79]. Вместе с IL-12 он индуцирует продукцию IFN- γ и TNF- α [80]. Самостоятельно IL-15 стимулирует продукцию NK-клетками GM-CSF и IFN- γ [80, 81]. После стимуляции IL-15 NK-клеток они начинают продуцировать MIP-1 α и MIP-1 β – хемокины для макрофагов [82, 83]. Эти хемокины относятся к классу C-C, которые также выступают в качестве хемоаттрактантов для самих NK-клеток. Ряд исследований показывает, что IL-15 может выступать в качестве одного из факторов, индуцирующих миграцию NK-клеток в зону маточно-плацентарного контакта [84]. Также IL-15 рассматривается как индуктор цитотоксической активности NK-клеток во время имплантации. После стимуляции IL-15 uNK-клетки начинали секретировать IFN- γ и IL-10. В свою очередь этот эффект полностью блокировался в присутствии TGF β . [85] Как и IL-2,

IL-15 может формировать из NK-клеток лимфокин-активированные киллерные клетки (ЛАК-клетки). Более того, IL-15 активировал цитотоксическую и антитело-зависимую клеточную цитотоксичность как у CD56^{bright}, так и у CD56^{dim} NK-клеток.[80] На клеточных моделях было показано, что IL-15 усиливает цитотоксический эффект dNK-клеток в отношении клеток трофобласта линии JEG-3. Однако, аналогичный эффект по отношению к клеткам вневорсинчатого трофобласта отсутствовал [74]. Любопытно, что IL-15 активирует экспрессию как активирующих (NKp44, NKp46), так и ингибирующих рецепторов (CD94/NKG2A). Также ряд исследований показывает, что IL-15 участвует в регуляции экспрессии мРНК, кодирующей перфорин и FasL [86, 87].

Существует предположение, согласно которому IL-15 не только индуцирует миграцию NK-клеток в зону маточно-плацентарного контакта, но и участвует в их дифференцировке. В качестве исходной популяции выступают NK-клетки периферической крови с фенотипом CD56^{bright}CD16^{c-kit}⁺. Именно они мигрируют из ткани матки, где в присутствии IL-15 и SCF дифференцируются в dNK-клетки. Стоит отметить, что CD56^{dim} NK-клетки плохо отвечают на стимуляцию с помощью IL-15 [88, 89].

Другим важным цитокином в зоне маточно-плацентарного контакта является IL-18. Его рецептор – гетеродимер, состоящий из α и β цепей. Этот рецептор на своей поверхности несут NK-клетки, макрофаги, нейтрофилы. В зоне маточно-плацентарного контакта IL-18 появляется уже на 4-ый день беременности. IL-18 влияет на экспрессию Fas рецептора на поверхности вневорсинчатого трофобласта, таким образом, он опосредованно регулирует инвазию трофобласта. Кроме того, IL-18R был обнаружен на поверхности клеток ворсинчатого трофобласта [90-92]. Еще одной важной биологической функцией IL-18 является запуск продукции IFN- γ Th1-лимфоцитами, NK-клетками, В-лимфоцитами, дендритными клетками. Его эффект усиливается в комбинации с IL-12. Кроме того IL-18 индуцирует выработку IL-4, IL-13 NK-клетками, базофилами, тучными клетками. Он также регулирует продукцию GM-CSF, TNF- α , IL-1 β , IL-8. Таким образом IL-18 – уникальный цитокин, который не только поддерживает врожденный иммунный ответ, но и участвует в Th1 и Th2 иммунном ответе [93-95].

IL-18 важный участник цитотоксического ответа. Он напрямую регулирует цитотоксическую активность NK-клеток. Этот цитокин может усиливать цитотоксический эффект за счет увеличения Fas/FasL рецепторов и увеличения количества гранзимов в NK-клетках. Однако, ряд экспериментов показал, что IL-18 не влияет на уровень экспрессии TRAIL. После активации децидуальных лимфоцитов с помощью IL-18, у NK-клеток повышалась цитотоксическая активность в отношении клеток линии K562. Во время

беременности уровень IL-18 повышается в первом триместре, продолжает увеличиваться, во время родов его концентрация становится еще выше, снижение концентрации IL-18 начинается только на третий день после родов [92, 96, 97].

IL-10 считается основным противовоспалительным цитокином, отвечающим за формирование иммунной толерантности по отношению к плоду. IL-10 очень удобен для исследования, так как его рецептор у человека и мыши очень похожи. Во время беременности пик содержания IL-10 в зоне маточно-плацентарного контакта приходится на начало беременности. IL-10 продуцируют макрофаги, NK-клетки, Т-лимфоциты [98-100].

Одной из ключевых задач IL-10 в зоне маточно-плацентарного контакта является регуляция процесса имплантации. Например, за счет снижения MMP-9 [101]. Эксперименты с мышами, у которых была снижена секреция IL-10, наблюдали ряд дефектов, а именно усиление инвазии трофобласта, что приводило к увеличению плаценты. Также в ряде экспериментов IL-10 снижал уровень экспрессии молекул МНС II на клетках трофобласта но усиливал экспрессию HLA-G. Таким образом, IL-10 может принимать участие в защите трофобласта от цитотоксической активности со стороны NK-клеток [102].

IFN- γ является одним из ключевых цитокинов врожденного и приобретенного иммунитета. Блокирует пролиферацию, индуцирует апоптоз. Запускает JAK/STAT1 сигнальный путь, который приводит к синтезу антигенов класса МНС-I и МНС-II, каспаз, CDKN1A. [103] Основными источниками IFN- γ , помимо децидуальных NK-клеток, являются децидуальные макрофаги, децидуальные CD8⁺ Т-клетки [104]. Клетки трофобласта также довольно интенсивно секретируют IFN- γ , но только в начале беременности. [105] IFN- γ обеспечивает формирование ткани плаценты, ингибируют миграцию клеток трофобласта, обеспечивают их скопление вблизи спиральных артерий. Главная задача IFN- γ ингибирование миграции трофобласта, ограничивая его внедрения в эндометрий, что особенно важно в III триместре беременности. Схожим действием обладают TNF- α и TGF- β . IL-1 β , 6, 8, IP-10, LIF наоборот стимулируют миграцию экстравилезного трофобласта (для LIF данные неоднозначные). VEGF, PLGF, GM-CSF стимулируют пролиферацию клеток трофобласта.

3. NK-клетки.

Натуральные киллеры (NK-клетки) – большие гранулярные лимфоциты. По размеру они больше Т и В лимфоцитов, содержат цитотоксические гранулы. Главная их особенность – способность уничтожать раковые клетки без специфичной иммунизации. Цитотоксическое

действие NK-клеток сходно с таковым у Т-лимфоцитов. Они выпускают цитотоксические гранулы, которые содержат гранзимы и перфорины. В отличие от Т-лимфоцитов NK-клетки для распознавания мишени используют ограниченное число рецепторов, заложенное генами зародышевой линии. Для элиминирования клетки-мишени NK-клетки могут использовать молекулу TRAIL. Данная молекула входит в TNF-семейство и, связываясь со своими рецепторами (рецепторы смерти: DR4 и DR5) на поверхности другой клетки, активирует в ней каспазу-8, которая запускает апоптотический каскад. NK-клетки также несут на своей поверхности FC-рецептор, что позволяет им идти по пути АЗКЦ (антителозависимая клеточная цитотоксичность) [106, 107].

Цитотоксическое действие NK-клеток усиливается в присутствии цитокинов (IFN- α , IL-12). При совместном действии IL-12 и IL-18 NK-клетки продуцируют большое количество IFN- γ . В свою очередь, IFN- γ напрямую активирует макрофаги, дендритные клетки. Последние обеспечивают дифференцировку CD4⁺ Т-лимфоцитов в сторону Th1 фенотипа. NK-клетки также продуцируют TNF- α , GM-CSF, CCL3, CCL4, CCL5 [106].

Главное отличие NK-клеток от других популяций лимфоцитов – отсутствие на них антигенспецифических рецепторов. С этим связано отсутствие клональной структуры популяции NK-клеток: все естественные киллерные клетки идентичны по строению их ключевых рецепторов [107]. Первое моноклональное антитело к NK-клеткам связывалось с антигеном CD16 (FC γ RIII). Это низкоаффинный рецептор к IgG, представленный на нейтрофилах и моноцитах. CD16 индуцирует антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) [108]. CD56 (молекула гомофильной адгезии, экспрессируется на нервных и мышечных клетках, N-CAM) – еще один важный маркер на поверхности NK-клеток. Он принимает участие в гомофильной адгезии и обладает возможностью связывать FGFR1 [109, 110]. Стоит отметить, что ни один из этих маркеров не специфичен для NK-клеток [107]. Один из рецепторов характерный для CD56^{bright} клеток и отсутствующий на CD56^{dim} – CD117 (c-kit), который связывается с SCF. Еще одним важным фенотипическим отличием этих двух популяций является рецептор к IL-2. Данный рецептор состоит из трех полипептидов α , β , и γ -цепей. CD56^{bright} экспрессируют на своей поверхности α -цепь (IL-2R α , CD25) и β -цепь (IL-2R β , CD122), что характерно для высокоаффинного комплекса. CD56^{dim} экспрессируют только IL-2R β , в этой форме данный рецептор обладает более низким аффинитетом и связывает не только IL-2, но и IL-15 [111]. Кроме того, для инициации пролиферации CD56^{bright} NK-клеток достаточно пиколярной концентрации IL-2, ее также можно усилить с помощью IL-15 или лиганда к CD117 [112, 113]. Напротив,

CD56^{dim} отвечают повышением цитотоксичности только на наномолярные концентрации IL-2 [114].

NK-клетки также экспрессируют различные молекулы клеточной адгезии. Так, например, на поверхности NK-клеток располагается C3 рецептор (CR3), также характерный для фагоцитарных клеток, Т и В лимфоцитов. Этот рецептор относится к семейству β_2 -интегринов, к которому относятся такие рецепторы как: LFA-1 и CR4. Для всех этих рецепторов характерно наличие β -цепи (CD18) и одной из трех α -цепей. LFA-1-(CD11a/CD18), CR3-(CD11b/CD18), CR4(CD11c/CD18).[115] LFA-1 выполняет адгезионную функцию, в качестве лигандов для него выступают такие молекулы клеточной адгезии как: ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3. Точно не установлено, как LFA-1 влияет на цитотоксические свойства NK-клеток. Есть данные, что он не нужен для клеточно-опосредованного цитолиза [116]. Хотя более современные данные показывают, что наличие на клетке ICAM-1 и ICAM-2 запускает поляризацию цитотоксических гранул в NK-клетках [117]. Также есть данные согласно которым, уровень экспрессии CD11a на поверхности CD56^{dim} выше чем на CD56^{high} [118, 119]. И это логично, так как лиганды к CD11a преимущественно расположены на эндотелиальных клетках, вблизи воспаления [120]. В экспериментах *in vitro* было показано усиление экспрессии CD11a на мигрирующих клетках, CR3 ($\alpha_M\beta_2$ -интегрин, Mac-1) регулирует диапидез лейкоцитов через эндотелий путем генерации контактов с ICAM-1 [121, 122]. Кроме того, CR3 отвечает за дегрануляцию и фагоцитоз, направленные против иммунных комплексов, опсонизированных iC3b [115, 123].

Важной адгезионной молекулой NK-клеток является L-selectin (CD62L). CD62L играют важную роль в транспорте лимфоцитов по кровяному руслу, регулирует инициацию роллинга, адгезию к эндотелиальной стенке сосуда [124]. Согласно исследованиям *in vitro*, NK-клетки с более высоким уровнем экспрессии CD62L эффективней прикрепляются к венам с высокой эндотелиальной стенкой периферических лимфатических узлов, так как на них экспрессируются лиганды к CD62L [125]. Логично, что CD56^{high} клетки, доминирующие в лимфатических узлах, характеризуются повышенной экспрессией CD62L [125, 126]. Более того, NK-клетки обладают более высоким уровнем экспрессии CD62L по сравнению с остальными лейкоцитами крови, включая Т-клетки, В-клетки, нейтрофилы и моноциты [125]. Согласно исследованиям, L-селектин, связанный с моноклональными антителами или со своим лигандом GlyCAM-1 (glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1), регулирует аффинность LFA-1 у нейтрофилов и Т-лимфоцитов, тем самым способствуя экстравазации лейкоцитов [127].

На поверхности NK-клеток также экспрессируется Human NK-1 (HNK-1, CD57). Эта адгезионная молекула характерна для CD8⁺ Т-лимфоцитов. Кроме того, существует корреляция между экспрессией CD57 и возрастом Т-лимфоцитов, его расценивают как маркер старения Т-лимфоцитов [128]. В случае NK-клеток CD57 экспрессируется на 30%-60% клеток с фенотипом CD56^{dim} CD16^{bright} и не экспрессируется на CD56^{bright} клетках. Молодые NK-клетки или не экспрессируют CD57, или экспрессируют, но очень слабо, а экспрессия CD57 увеличивается с возрастом. CD57⁺ NK-клетки не только плохо пролиферируют *in vitro*, но и хуже отвечают на действие IL-2 и IL-15. Согласно исследованиям, CD57⁺ NK-клетки активней принимают участие в цитотоксических реакциях, опосредованных CD16, клетки с фенотипом CD57⁺ CD56^{dim} CD16⁺, продуцируют больше IFN- γ , чем CD57⁻CD56^{dim} CD16⁺, после связывания CD16 с антигеном [129].

Ключевой адгезионной молекулой NK-клеток является CD56 (neural cell adhesion molecule, N-CAM), входит в суперсемейство иммуноглобулинов, регулирует клеточную адгезию, межклеточные контакты, перестройку цитоскелета [130]. CD56 экспрессируется на NK-клетках, моноцитах, субпопуляции Т-клеток (CD8⁺, активированные с помощью IL-2) [131], клетках эндокринных тканей [108]. N-CAM осуществляет гомофильную cell-cell адгезию, состоит из пяти внеклеточных иммуноглобулиновых доменов и двух внутриклеточных фибронектин-подобных доменов [132].

К адгезионным молекулам NK-клеток также относится LFA-2 (CD2). CD2 вместе с такими молекулами как: CD4, CD8, CD28, является ко-рецептором, участвующим в активации NK-клеток, и входит в состав суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF). Связывание этих ко-рецепторов с их лигандами приводит к формированию контакта между эффекторной клеткой и антиген-презентирующей клеткой. Такое cell-cell взаимодействие инициирует передачу сигналов, секрецию цитокинов, цитотоксичность. CD2 также входит в особую субпопуляцию в составе IgSF, которая называется CD2-субпопуляцией (CD-2subsets). В ее состав входят: CD48, CD58, CD84, сигнальные молекулы, активирующие лимфоциты (signaling lymphocytic activation molecule – SLAM), 2B4(CD244) и Ly-9. Эти молекулы экспрессируются на NK-клетках и цитотоксических Т-лимфоцитах [133-135]. Связывание этих молекул со специфичными моноклональными антителами приводит к активации клеточно-опосредованного цитолиза [133], а связывание 2B4 также запускает секрецию IFN- γ , IL-2 [136], происходит экзоцитоз гранул [133]. Таким образом, перечисленные выше молекулы осуществляют распознавание NK-клетками своих мишеней независимо от MHC I. Существует группа молекул, которая объединяется в SRR (SLAM-related receptors). В эту группу входят CD244, NTB-A (NK-T-B cell Ag) и CS1 (CRACC) [137,

138]. NTB-A и CS1 являются своими собственными лигандами и могут активировать NK-клетку в ходе гомофильного взаимодействия [139-141]. CD244 связывается с CD48 [142] – заякоренным при помощи GPI-якоря и широко распространенного как в гемопоэтической системе, так и на всех NK-клетках. 2B4 – это важный модулятор активности NK-клеток и других лимфоцитов [143-145]. Он костимулирует сигналы полученные другими рецепторами NK-клеток [146, 147]. Есть данные, что взаимодействие CD244 с CD48 не влияет на пролиферацию NK-клеток, но увеличивает их цитотоксическую активность [148].

3.1. Роль рецепторов в поведении NK-клеток.

Основной задачей клетки иммунной системы, кроме элиминирования патогена, является распознавание собственных клеток организма, изменённых в результате мутации или зараженных вирусом. Для выполнения первой задачи NK-клетки несут на своей поверхности TLR (TLR2, TLR3, TLR5, TLR6, TLR1) [149]. Для выполнения второй задачи NK-клетки используют сложную систему активирующих и ингибирующих рецепторов. NK-клетки могут детектировать изменения в поверхностном фенотипе клетки, которые возникают на ней в результате изменений в метаболизме («dysregulated self»). Эти изменения также могут быть связаны с инфицированием клетки, мутацией, стрессом, тепловым шоком («stress-induced self»). Каждый из этих факторов меняет молекулы на поверхности клетки, с которыми может связаться один из активирующих рецепторов NK-клетки. Кроме разделения на активирующие и ингибирующие рецепторы NK-клеток можно подразделить еще на две большие группы: распознающие молекулы главного комплекса гистосовместимости и распознающие другие молекулы на поверхности клеток-мишеней [107].

Ингибирующие рецепторы NK-клеток распознают молекулы, которые характерны для большинства клеток организма. Например, молекулы MHC-I-ого класса – гликопротеины, представленные на всех клетках организма за исключением эритроцитов. Таким образом NK-клетки не атакуют клетки собственного организма. Интерфероны могут усиливать экспрессию молекул MHC-I на поверхности клеток. В свою очередь, клетки, зараженные вирусом и лишенные молекул MHC-I, подвергаются цитотоксической атаке. Вирусы и ряд других внутриклеточных патогенов снижают уровень экспрессии MHC-I молекул в инфицированных клетках, во избежание контакта с Т-лимфоцитами, однако это может послужить сигналом для NK-клеток. Таким образом потеря этих молекул, а, следовательно, снижение активности ингибирующих рецепторов, может привести к активации NK-клетки по принципу отсутствия своего («missing self») [107].

Ряд рецепторов NK-клеток, регулирующих их поведение, входят в семейство KIR рецепторов (killer cell immunoglobulin-like receptor). Эти рецепторы отличаются количеством иммуноглобулиновых доменов. Так у рецептора KIR-2D их два, а у рецептора KIR-3D их три. Гены, кодирующие KIR рецепторы, входят в состав крупного кластера генов – LRC (leukocyte receptor complex). Существует другой кластер генов – NKC (NK receptor complex). Гены из кластера NKC кодируют KLR рецепторы (killer cell lectin-like receptors). Рецепторы из обеих групп могут быть как активирующими, так и ингибирующими. Действие рецептора определяет определенный мотив в цитоплазматическом домене рецептора. У ингибирующих KIR рецепторов – это длинный ITIM домен (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif). Примером таких рецепторов могут служить KIR-2DL или KIR-3DL, где L обозначает наличие ITIM домена. Когда рецептор связывается с лигандом происходит фосфорилирование тирозина в ITIM домене за счет работы тирозин киназы из Src-семейства. После фосфорилирования ITIM домен связывается с тирозин фосфатазами SHP-1 и SHP-2. Эти фосфатазы связываются с фосфатом на других рецепторах, тем самым блокируя их. У активирующих KIR рецепторов (KIR-2DS, KIR-3DS, где S означает short) отсутствует ITIM домен. Вместо этого у них есть участок, способный связываться с сигнальным белком DAP12. Последний – гомодимерный, трансмембранный белок, содержащий ITAM домен (immunoreceptor tyrosine-based activation motif). После связывания с лигандом ITAM участок фосфорилируется, после чего соединяется и активирует тирозин киназы Syk или ZAP-70, дальнейший сигнальный каскад напоминает таковую у Т-лимфоцитов. В результате происходит активация PLC-γ, благодаря которой активируются транскрипционные факторы в ядре клетки CD160. [150, 151].

Пример KLR-рецептора у человека – CD94/NKG2. Это гетеродимер, состоящий из двух рецепторов семейства лектинов C-типа. Его лиганд – неклассические молекулы МНС-I класса, в том числе и HLA-E. Стоит отметить особенность последней молекулы. Она связывается и презентует пептиды, которые входят в состав лидирующей последовательности белков, полученных от других молекул МНС во время их процессинга в эндоплазматическом ретикулуме. Таким образом, пептиды, презентуемые HLA-E отражают экспрессию других молекул МНС на клетке, позволяет улавливать изменения, возникающие в результате инфицирования клетки вирусом. У человека выделяют пять вариантов NKG2 белка: NKG2A, NKG2C, NKG2D, NKG2E, NKG2F. Принцип проведения сигнала у этих рецепторов схож с KIR-рецепторами. Так у ингибирующего NKG2A рецептора есть ITIM домен, а активирующий NKG2C связан с молекулой DAP12. NKG2D отличается от остальных рецепторов семейства NKG2 как строением, так и функциями. Это

активирующий рецептор, который не образует гетеродимер с CD94, но экспрессируется в качестве гомодимера, для передачи сигнала использует адаптерные белки DAP-10, DAP-12. Структурный анализ показал, что один гомодимерный рецептор NKG2D может связываться с четырьмя молекулами DAP-10. Для мышей характерно две изоформы данного рецептора. Длинная (NKG2D-L), которая может связываться только с DAP-10 и короткая форма (NKG2D-S), которая связывается как с DAP-10, так и с DAP-12. У человека экспрессируется только длинная изоформа данного рецептора (NKG2D-L) [152]. В качестве лигандов для NKG2D выступают особые молекулы, кодируемые генами MHC I класса MICA и MICB. Другая группа лигандов включает в себя четыре белка ULBP (ULBP 1-4) [153, 154]. Роль этих молекул как объекта распознавания NK-клетками обусловлена их экспрессией только на трансформированных, инфицированных или подвергшихся стрессорному воздействию клетках [107].

NK-клетки распознают не только молекулы MHC-I. Они также несут рецепторы, предназначенные для распознавания инфицированных, поврежденных, опухолевых клеток напрямую, не через молекулы MHC. К этим рецепторам относят: активирующие NCR рецепторы (natural cytotoxicity receptors) (NKp30, NKp44, NKp46), Ly49H рецептор (рецептор семейства лектинов C-типа) и NKG2D. Важно отметить, что NKp30 и NKp46 экспрессируются на всех NK-клетках конститутивно, в то время как, NKp44 экспрессируется на NK-клетках только при их стимуляции IL-2 [155]. Данные рецепторы играют основную роль в борьбе NK-клеток против опухолевых клеток. Это показано в исследованиях по удалению отдельных NCR-рецепторов, что снижало способность NK-клеток лизировать опухолевые клетки [86, 156]. NKp30 также отвечает за взаимодействие NK-клеток с дендритными клетками [157].

Лиганды к этим рецепторам разнообразны. Так они могут связывать гемагглютинин. Ly49H связывается с вирусным белком m157 – структура подобная молекуле MHC-I. NKp30 связывается с белком B7-H6. Лиганды к NKG2D появляются на опухолевых клетках, клетках, инфицированных вирусом. Кроме NK-клеток NKG2D распознают все CD8⁺ Т-лимфоциты, NKT клетки, γ/δ Т-лимфоциты. Способ передачи сигнала от NKG2D в клетку также отличается. NKG2D связан с адапторным белком DAP10. Этот белок не содержит ITAM последовательности, вместо этого он активирует PI3-киназу [106].

В отличие от других KLR-рецепторов NKG2D связывается с рядом молекул MHC-I класса, которые экспрессируются клеткой во время стресса. К ним относятся MIC молекулы: MIC-A, MIC-B, белки семейства RAET1. Структура этих молекул напоминает строение $\alpha 1$ и $\alpha 2$ доменов молекул MHC-I класса. Гены, кодирующие эти особые молекулы MHC,

объединяют в MHC семейство. Эти MHC-Ib гены контролируются иначе, чем классические молекулы локуса MHC-I класса. Существует семь MHC генов, но только два из них (MHC-A и MHC-B) обеспечивают синтез белков. Молекула HLA-E также относится к классу MHC-Ib молекул. Данная молекула связывается с определенной группой не полиморфных пептидов – Qa-1 determinant modifiers (Qdm) Белки семейства RAET1 (или UL16-binding proteins) также экспрессируются в момент заражения клетки [106, 107].

Рецепторы семейства LIR (leukocyte immunoglobulin-like receptors, ILT, CD85) – ингибирующие рецепторы, которые экспрессируются на NK-клетках и связываются с молекулами MHC-1 [158]. На поверхности NK-клеток экспрессируются ILT2,3,4,5. ILT2 и ILT4 ингибируют цитотоксичность NK-клеток, а в качестве лигандов к ним выступают молекулы HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-G, HLA-E. ILT-3 также снижает цитотоксичность, связываясь с HLA-G [159-161]. К сожалению, функции LIR рецепторов в регуляции активности NK-клеток недостаточно изучены. Известно, что один из рецепторов этого семейства обладает большим аффинитетом к человеческому цитомегаловирусу, чем к MHC-1 [162].

Упомянутый выше рецептор семейства SLAM (signaling lymphocyte activation molecule) – 2B4 связывается с молекулой CD48, которую несут сами NK-клетки. Благодаря такому взаимодействию увеличивается их жизнеспособность, индуцируется пролиферация NK-клеток через SAP (SLAM-associated protein), Src и Fyn киназы. Были получены результаты, согласно которым, данный рецептор выступает как в роли активирующего, так и в роли ингибирующего рецептора. Поэтому принято считать, что данный рецептор – многофункциональный и может посылать и активирующие, и ингибирующие сигналы. Тип сигнала зависит от представленной на клетке изоформы данного рецептора, стадии развития NK-клетки. [163] На NK-клетках человека 2B4 экспрессируется в виде двух изоформ, из которых только одна активирует их цитотоксические свойства. [164]

KLRG1 (killer cell lectin-like receptor G1) – ингибирующий рецептор, посылающий сигналы через ITIM. В качестве лигандов к нему выступают кадгеринины (E-, N- и R-кадгеринины). Так как, эти кадгеринины экспрессируются на здоровых тканях, можно предположить, что задача KLRG1 заключается в предотвращении лизиса здоровых тканей. [165] Также было показано, что KLRG1, связываясь с E-кадгерином злокачественных эпителиальных опухолей, позволяет им метастазировать. [166]

Существует еще ряд рецепторов NK-клеток, которые обеспечивают дальнейшую стимуляцию клеток, но не способны самостоятельно активировать или ингибировать ее. К

таким рецепторам относятся DNAM-1, NKR-P1 и PILR рецепторы. Их обозначают, как костимулирующие рецепторы.

NKR-P1 рецепторы – мембранные гликопротеиновые рецепторы второго типа, которые входят в CTLD (с-type lectin domain family). На сегодняшний день у человека идентифицировано пять изоформ данного рецептора NKR-P1A, B, C, D, F. [167, 168] NKR-P1D/B содержат ITIM-домен, что предполагает их ингибирующую функцию. Лигандами к ним выступает гликопротеин Osl/Clr-b, который экспрессируется на гематopoэтических клетках, и Clr-g – С-лектин, экспрессируемый на активированных НК-клетках. Эти рецепторы могут участвовать в противоопухолевых процессах, так как на опухолевых клетках снижена экспрессия Osl/Clr-b [168]

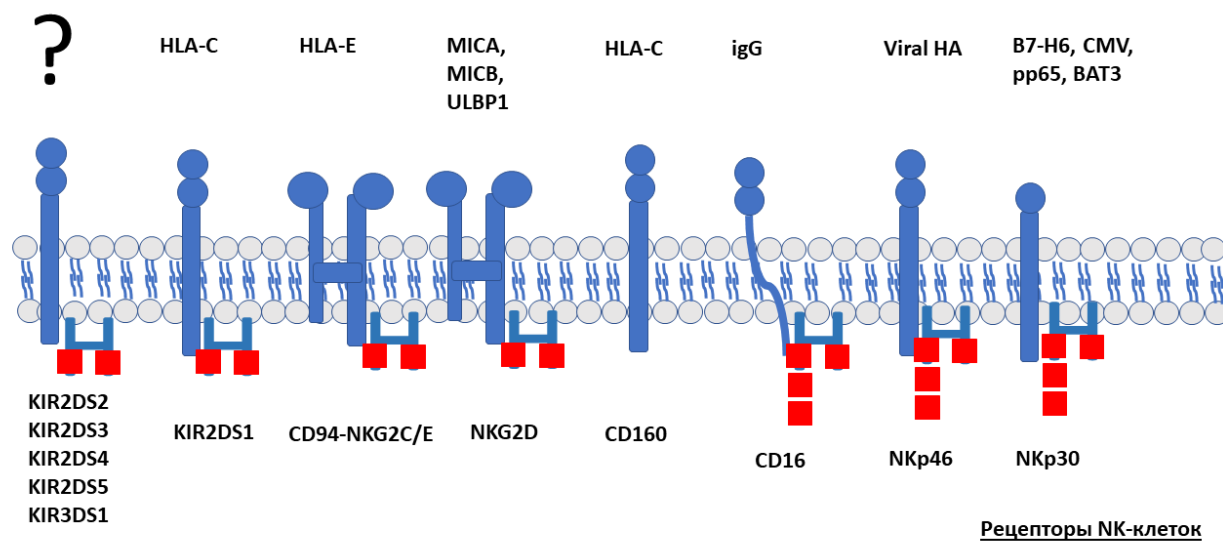
DNAM-1 рецептор (CD226) – член ig-суперсемейства и экспрессируется на 50% НК-клеток. В качестве лигандов к нему выступают молекулы CD155 (она же рецептор полиовирусов) и CD112 (Нектин-2). Согласно исследованиям, повышение уровня экспрессии CD155 повышает способность НК-клеток к клеточно-опосредованному лизису. Есть предположения, что DNAM-1 принимает участие в миграции НК-клеток, так как было показано его участие при миграции моноцитов через эндотелиальные клетки. Возможно, DNAM-1 также принимает участие в образовании связей между НК-клеткой и клеткой-мишенью. [169, 170]

PIL β (paired Ig-like receptor) – гликопротеиновый рецептор первого типа, который связывается с DAP-12 и расценивается как активирующий рецептор. Напротив, PIL α содержит ITIM домен и рассматривается, как ингибирующий рецептор. В качестве лиганда к этим рецепторам выступает PILR-L (CD99), а эксперименты с мышиными НК-клетками показали, что НК-клетки лизируют PILR-L⁺ клетки мишени.[171, 172]

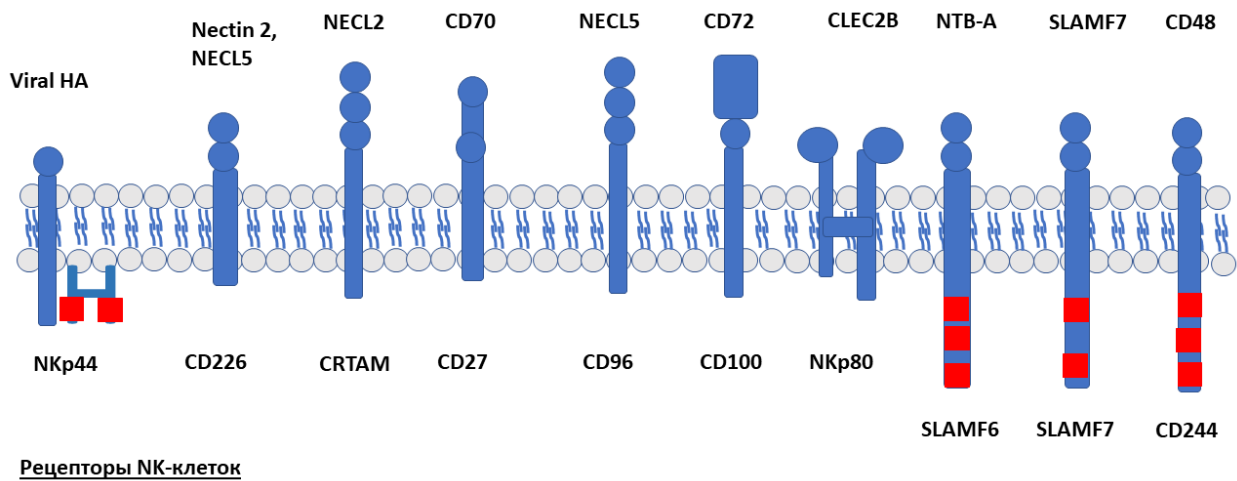
Таким образом, несмотря на то, что у НК-клеток отсутствует механизм реаранжировки генов, характерный для Т и В лимфоцитов, данная клеточная популяция обладает широким репертуаром рецепторов (Рисунок 3). Более того, каждая клетка может нести на своей поверхности разные комбинации этих рецепторов, каждый из которых экспрессируется по-разному в зависимости от факторов микроокружения. Все это дает НК-клетке возможность для высокоспециализированного взаимодействия с другими клетками.

Активирующие

Лиганды

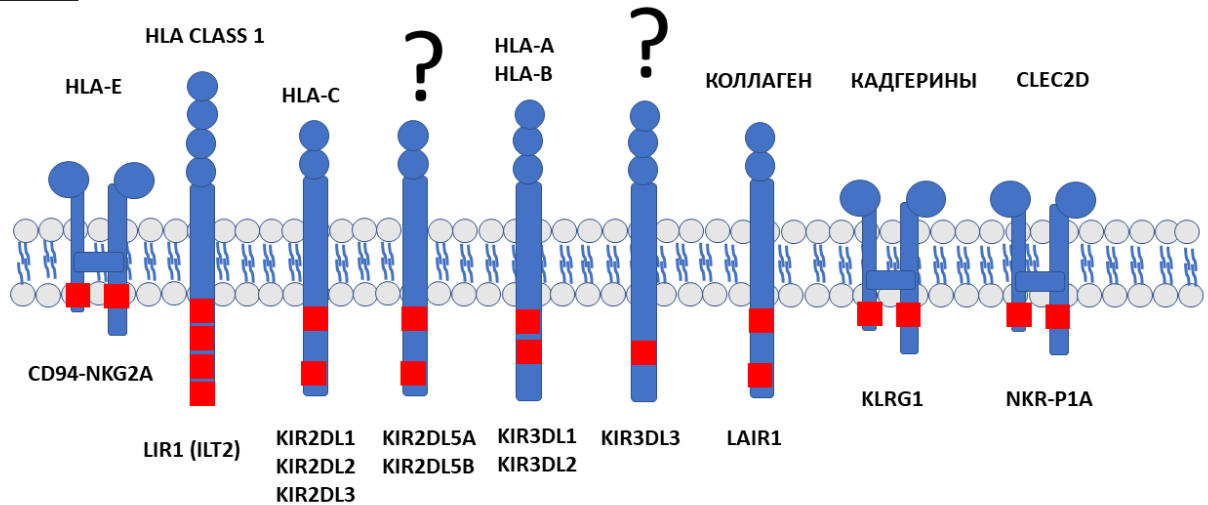


Лиганды



Ингибирующие

Лиганды



Рецепторы NK-клеток

Рисунок 3. Активирующие и ингибирующие рецепторы NK-клеток, и их лиганды.

3.2. NK-клетки – «прирожденные убийцы».

Главная функция NK-клеток – уничтожение клеток мишеней. NK-клетки располагают несколькими способами элиминирования клетки мишени:

- Контактный цитоллиз с участием цитотоксических гранул.
- Контактный цитоллиз с участием рецепторов «смерти».
- Дистантный цитоллиз с использованием цитокинов.

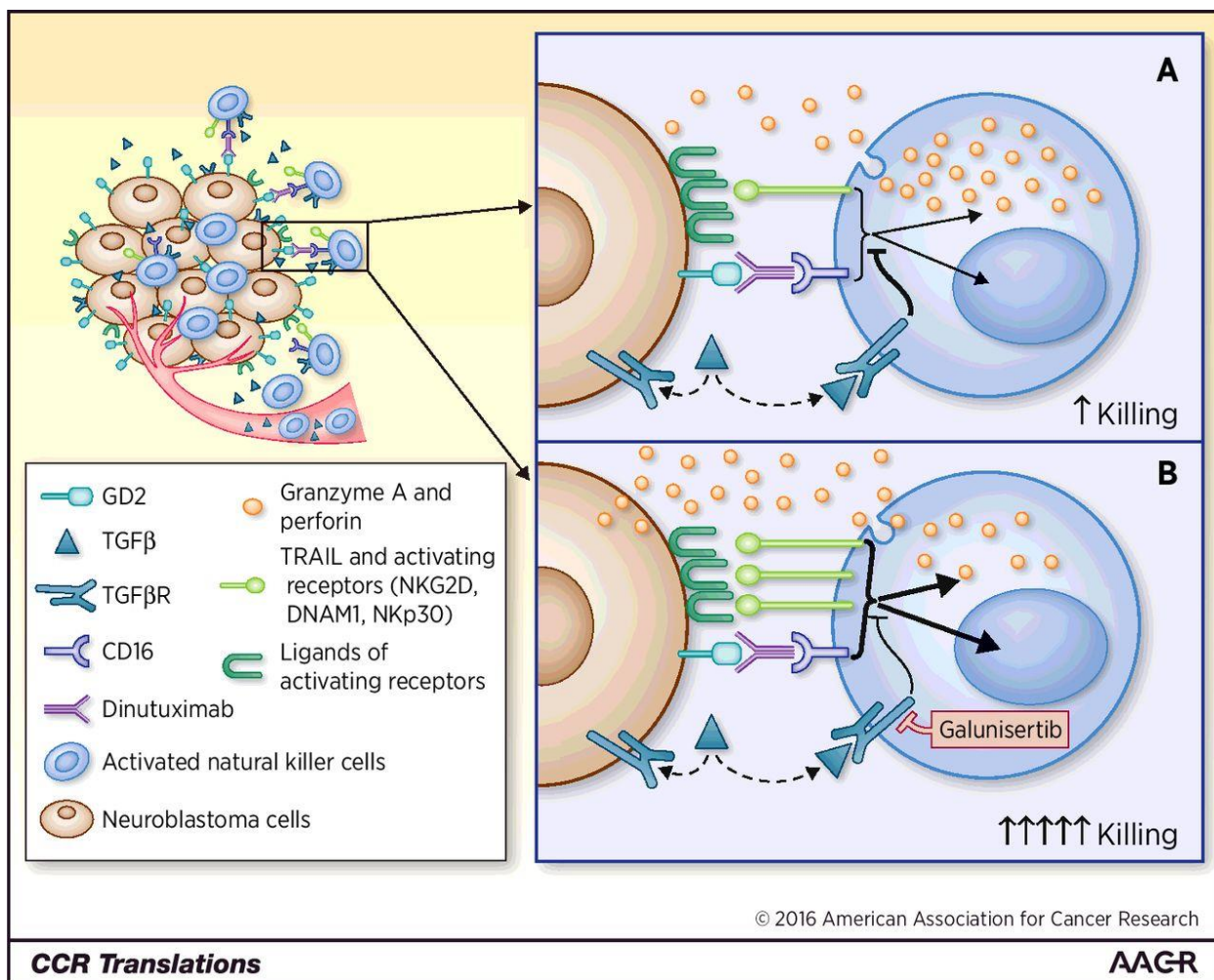


Рисунок 4. Методы элиминации NK-клетками клеток-мишеней.

3.2.1. Контактный цитоллиз с участием цитотоксических гранул.

Цитотоксические гранулы NK-клеток представлены органеллами, которые совмещают в себе депонирующую, секреторную и деградационную функции. Главные компоненты гранул NK-клеток: перфорин (белок разрушающий мембрану клеток) и гранзимы (сериновые протеазы). На сегодняшний день описано 11 гранзимов, из них пять у человека (A, B, H, K, M). GrzA и GrzK проявляют трипсин-подобную активность. GrzB запускает каскад апоптоза напрямую или через активацию клеточных каспаз. Изначально представление о перфорин-гранзимовом механизме сводилось к следующему: перфорин разрушает мембрану клетки, после чего в нее проникает гранзим, который запускает каскад апоптоза. Однако, было показано, что гранзим может проникнуть в клетку благодаря рецептор-опосредованному эндоцитозу. В данном случае в качестве рецептора выступает рецептор к манноза-6-фосфату. Однако, эти данные неоднозначны. Ряд исследований показал, что при проникновении гранзима по эндоцитозному механизму, не происходит его

активация. (обзорная статья) Есть данные, согласно которым GrzM вместе с перфорином индуцируют клеточную гибель по каспаза-независимому пути [173] .

NK-клетки могут связываться с клетками мишенями (по некоторым данным до 4) [174] в результате чего образуется иммунологический синапс (ИС). Сначала происходит распознавание клетки мишени, в этом участвуют молекулы CD2 и CD16, после этого происходит мягкая адгезия в первую очередь за счет интегринов (LFA-1, MAC-1)[175]. После этого идет взаимодействие активирующих и ингибирующих рецепторов NK-клеток с их лигандами. Если преобладают активационные сигналы начинается следующая стадия образования ИС. В начале происходит полимеризация G-актина в F-актин при помощи WASP белков. За счет перестройки цитоскелета меняется и форма клетки. Параллельно происходит кластеризация рецепторов. Многие авторы выделяют в ИС две структуры: периферический и центральный супермолекулярные активационные кластеры. В состав первого входят молекулы, принимающие участие в первых этапах (CD2, интегрины), они формируют структуру типа кольца. Задача центрального комплекса доставить литические гранулы к ИС. Сначала литические гранулы собираются в ЦОМТ, при помощи динеиновых моторов. Затем гранулы движутся к границе синапса либо по отдельности, либо в составе ЦОМТ. В этом процессе принимают участие Миозин IIА и GTP-аза RAB27a. Слияние плазматической мембраны клетки и мембраны гранул происходит благодаря SNARE белкам. После этого перфорины и гранзимы связываются с клетками-мишенями. После этого перфорины и гранзимы связываются с клетками-мишенями. Ключевой гранзим NK-клеток – гранзим В, который после проникновения в клетку запускает как каспазанезависимый апоптоз (активация BID, который запускает митохондриальный путь апоптоза), так и каспазный путь (активация прокаспазы-3 и ряд других каспаз) [176, 177].

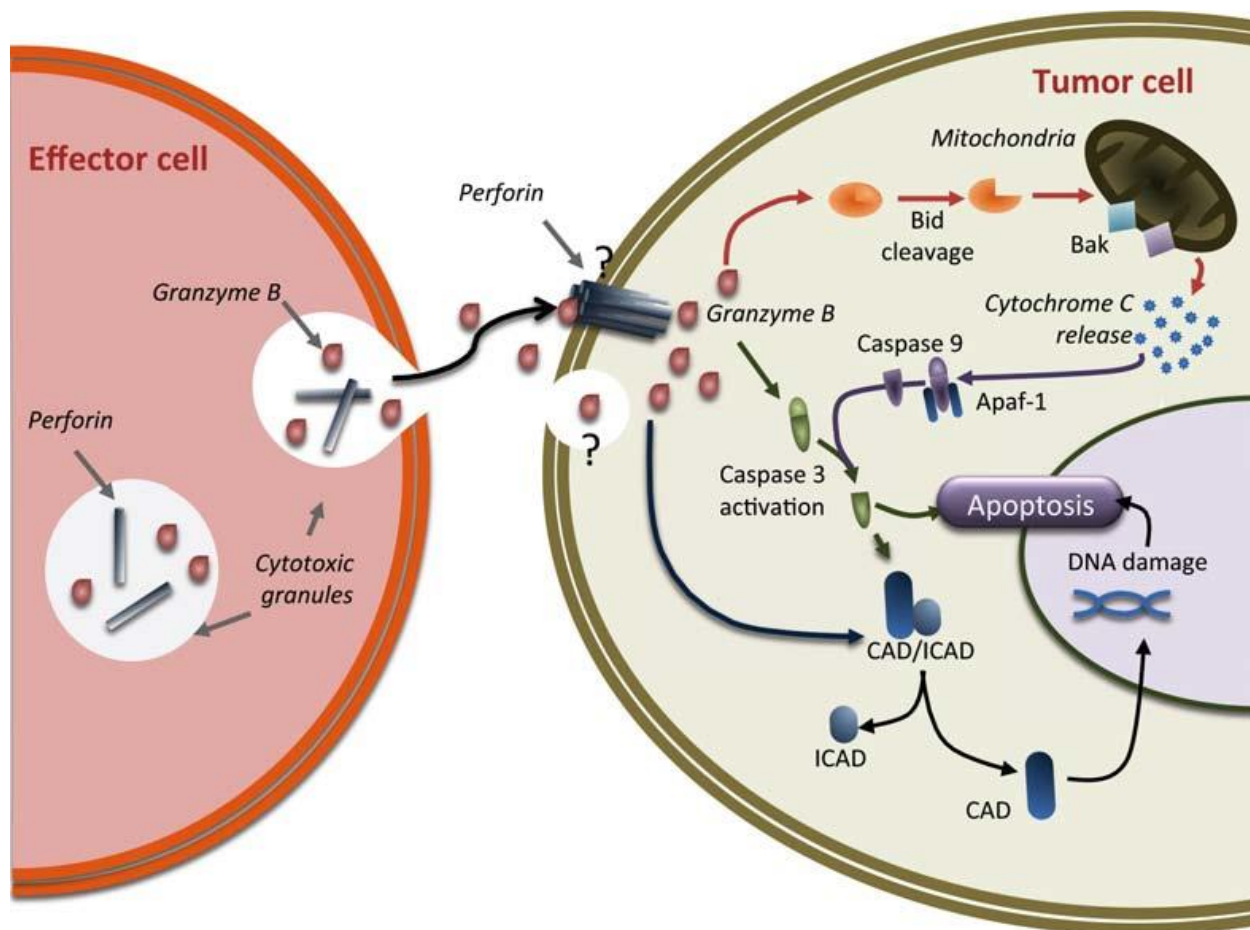


Рисунок 5. Механизм действия перфорин-гранзимовой системы (Взято из «Bispecific Antibodies: An Innovative Arsenal to Hunt, Grab and Destroy Cancer Cells», Cindy Grandjenette, Current Pharmaceutical Biotechnology, Август, 2015)

3.2.2. Контактный цитоллиз с участием рецепторов «смерти».

НК-клетки также могут осуществлять киллинг при помощи «рецепторов смерти». Так НК-клетки секретируют молекулы семейства TNF (tumor necrosis factor, фактор некроза опухоли) – TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand, Apo2). У человека найдено пять рецепторов к этим лигандам, два из которых TRAIL-R1 (DR4) и TRAIL-R2 (DR5) проводят апоптотический сигнал [178]. Экспрессия TRAIL повышается в присутствии IL-2, IFN, IL-15. Еще одним представителем семейства, который характерен для НК-клеток – Fas-лиганд (FasL, CD178). В покоящихся цитотоксических лимфоцитах он экспрессируется на внутренней поверхности мембраны литических гранул. Индукция апоптоза происходит при связывании с молекулами Fas (CD95) на поверхности клетки мишени. Стоит отметить, что многие опухолевые клетки не экспрессируют CD95, однако, НК-клетки стимулируют его экспрессию при помощи IFN- γ . Такие ингибиторы апоптоза как FLIP могут предотвращать FasL путь апоптоза [179, 180].

3.3. Дифференцировка NK-клеток, разнообразие субпопуляций и их особенности.

Как было сказано выше, NK-клетки обладают большим количеством рецепторов и адгезионных молекул. Благодаря большому количеству возможных комбинаций каждая NK-клетка приобретает уникальный фенотип. Хотя некоторые NK-клетки отличаются незначительно, в силу особенностей микроокружения, цитокиновой сети, в различных органах человека формируются уникальные субпопуляции NK-клеток со своими функциональными особенностями. Широкий репертуар рецепторов NK-клеток также осложняет изучение их дифференцировки, так как трудно выделить именно те рецепторы, которые определяют данный конкретный этап дифференцировки NK-клетки.

NK-клетки образуются в костном мозге. Его микроокружение (другие гемопоэтические клетки и строма) крайне важно для обеспечения выживания, пролиферации, дифференцировки и апоптоза NK-клеток на данном этапе [181]. Таким образом, среди CD34⁺ гемопоэтических клеток (ГМПК) костного мозга содержатся NK-клетки, которые на данном начальном этапе дифференцировки называют пре-NK. В экспериментах *in vitro* было показано, что клетки костного мозга и клетки стромы способствовали дифференцировке NK-клеток [182]. Цитокины оказывают огромное влияние на дифференцировку клеток. В случае NK-клеток ведущий цитокин - IL-2. Однако, этот цитокин продуцируют только Т-лимфоциты, активированные антигеном. Кроме того, не удалось обнаружить этот цитокин в строме костного мозга [183]. В связи с этим внимание ученых переключилось на другой цитокин – IL-15. Согласно исследованиям стромальные клетки костного мозга продуцируют IL-15, рецепторы к IL-2 и IL-15 содержат одинаковые субъединицы: IL-2/IL-15R β (CD122). Также было показано, что у мышей с нарушениями в проведении сигнала от IL-15R (например, из-за Jak3 или STAT5a/b) происходит сбой в формировании пула преNK. На основе этих исследований IL-2/IL-15R β γ комплекс стал маркером преNK-клеток у мышей. К сожалению, на CD34⁺ клетках человека сложно детектировать CD122, поэтому пришлось прибегнуть к рассмотрению различных суррогатных антигенов: CD7, CD10, CD45RA, для того чтобы выделить преNK-клетки из пула CD34⁺ клеток. Было продемонстрировано, что только клетки с фенотипом CD34⁺CD45RA⁺ отвечают на действие IL-2/IL-15 и соответствуют человеческим преNK-клеткам [184-186]. Хотя IL-15 играет ключевую роль на ранних этапах дифференцировки NK-клеток такие классические факторы как: c-kit ligand, flt3 ligand, усиливают дифференцировку NK-клеток, однако только в содействии с IL-15. Кроме того, flt3 вместе с IL-15 индуцирует экспрессию NK-клетками молекулы CD122. Таким образом, формируется уникальная субпопуляция CD34⁺CD122⁺CD38⁺. Такие клетки не

экспрессируют CD7, CD56, NKR, не проявляют цитотоксической активности в отсутствии IL-15. Можно говорить о том, что расхождения в путях дифференцировки НК-клеток возможны на самых ранних этапах [183].

Помимо костного мозга важными органами дифференцировки НК-клеток являются лимфатические узлы. Как было показано, в лимфатических узлах содержится много ГМПК с фенотипом $CD34^{dim}CD45RA^{+}$, которые в присутствии IL-2 или IL-15 могут дифференцироваться в $CD56^{+}$ НК-клетки. Более того, $CD34^{dim}CD45RA^{+}$ и $CD56^{bright}$ НК-клетки локализуются в одной и той же зоне лимфатического узла – паракортикальной (Т-клеточной) области. Также эти клетки несут широкий репертуар адгезионных молекул: L-selectin, $\alpha 4$ -integrin, $\beta 7$ -integrin [185]. Дальнейшие эксперименты показали, что сокультивирование Т-лимфоцитов и $CD34^{dim}$ ГМПК, полученными из лимфатического узла, приводило к дифференцировке последних в $CD56^{bright}$ НК-клетки. Вероятно, Т-лимфоциты индуцируют дифференцировку НК-клеток через продукцию IL-2 [187].

Можно предположить, что НК-клетки формируются в костном мозге (проНК-клетки). После чего НК-клетки с фенотипом $CD34^{+}CD45RA^{+}$ LPA-1⁺ мигрируют в лимфатические узлы, где в присутствии IL-2, секретируемого Т-лимфоцитами дифференцируются в $CD56^{bright}$ (преНК-клетки), которые затем образуют популяцию $CD56^{dim}$ НК-клеток. Последующие исследования развития НК-клеток были направлены на определение промежуточных этапов дифференцировки НК-клеток и их характерных фенотипических маркеров. В качестве таких маркеров выступили молекулы CD94 и CD117 (рецептор фактора роста тучных и стволовых клеток). Для НК-клеток на разных этапах дифференцировки были продемонстрированы следующие фенотипы: $CD34^{+}CD117^{-}CD94^{-}$, $CD34^{+}CD117^{+}CD94^{-}$, $CD34^{-}CD117^{+}CD94^{-}$, $CD34^{-}CD117^{-}CD94^{+}$ [188].

ПроНК-клетка ($CD34^{+}CD117^{-}CD94^{-}$) в присутствии стромальных факторов (KL, FL) начинает экспрессировать CD122, в результате чего дифференцируется в преНК-клетку ($CD34^{+}CD117^{+}CD94^{-}$), которая в присутствии IL-15 дифференцируется дальше в незрелую НК-клетку ($CD34^{-}CD117^{+}CD94^{-}$). Незрелые НК-клетки уже начинают экспрессировать ряд антигенов: CD2 (молекула межклеточной адгезии), CD7 (принимает участие в межклеточных взаимодействиях), CD56, CD161, NKp44. Незрелые НК-клетки не могут продуцировать IFN- γ или отвечать на отсутствие МНС-I молекул с помощью клеточной цитотоксичности. $CD56^{bright}$ НК-клетки ($CD34^{-}CD117^{+/-}CD94^{+}$) также неоднородны. Так для клеток $CD117^{+}$ в отличие от $CD117^{low/-}$ не экспрессируют NKp46, NKG2D, NKG2A [189, 190].

NK –клетки совмещают в себе функции характерные как для клеток врожденного иммунитета, так и для клеток приобретенного иммунитета. Функции NK-клеток зависят от того, в какую популяцию они входят (от стадии их дифференцировки). На сегодняшний день по характеру экспрессии поверхностных маркеров выделяют 48 субпопуляций NK-клеток. В некоторой литературе выделяют пять субпопуляций NK-клеток: (1) $CD56^{bright}CD16^{-}$ (50-70% всех $CD56^{bright}$), (2) $CD56^{bright}CD16^{dim}$ (30-50% всех $CD56^{bright}$), (3) $CD56^{dim}CD16^{-}$, (4) $CD56^{dim}CD16^{bright}$, (5) $CD56^{-}CD16^{bright}$ [191]. Однако традиционно среди NK-клеток «грубо» выделяют две ключевых субпопуляции: $CD3^{-}CD56^{+}CD16^{-}$ и $CD3^{-}CD56^{-}CD16^{+}$. Прежде чем сравнивать популяции NK-клеток (их фенотип и их физиологическую роль), важно отметить, что в разных частях организма популяционный состав этих клеток сильно варьируется. Так в периферической крови присутствуют $CD56^{bright}$ и $CD56^{dim}$, но преобладают именно $CD56^{dim}$ NK-клетки. Ингибирующие рецепторы (KIR, ILT2) экспрессируются на поверхности $CD56^{dim}$ клеток и отсутствуют у $CD56^{bright}$. И наоборот активирующие рецепторы (NKp46, CD117) присутствуют на поверхности $CD56^{bright}$ и отсутствуют у $CD56^{dim}$. Способность к связыванию цитокинов (IL-1, IL-2, IL-21, IL-18) также лучше выражена у $CD56^{bright}$. Так как дальнейшая судьба NK-клеток различна, $CD56^{dim}$ мигрируют в места воспалений, а $CD56^{bright}$ мигрируют во вторичные лимфатические органы, то и их репертуар адгезионных молекул и хемокиновых рецепторов должен отличаться. Действительно, сильнее выражена экспрессия адгезионных молекул у $CD56^{bright}$. Цитотоксическая функция сильнее всего выражена у $CD56^{dim}$ клеток. Они содержат гораздо больше перфорины, гранзимов и цитолитических гранул, также они образуют больше связей с клетками мишенями (K562). Высокий уровень экспрессии CD16 позволяет им осуществлять антителозависимую клеточную цитотоксичность. Цитотоксическая активность убывает в ряду $CD56^{dim}$, $CD56^{bright}CD16^{dim}$, $CD56^{bright}CD16^{-}$. Однако, стимуляция IL-2 или IL-12 значительно повышает цитотоксическую активность всех NK-клеток. Секреторная активность гораздо выше у $CD56^{bright}$. Клетки этой популяции являются одними из самых важных источников IFN- γ . Они также продуцируют TNF- α , IL-10, IL-13. Картина во вторичных лимфатических органах отличается от таковой в периферической крови. Хотя в селезенке по-прежнему большинство клеток обладает фенотипом $CD56^{dim}CD16^{+}$, в лимфатических узлах все совсем наоборот. Более 95% клеток – $CD56^{bright}$, они локализуются в перифолликулярной зоне лимфатического узла. Исходя из того, что в лимфатических узлах расположено около 40% всех лимфоцитов (в периферической крови всего 2 процента), логично предположить, что именно лимфатические узлы являются основным резервуаром для NK-клеток. Также можно сделать вывод, что преобладают $CD56^{bright}$ клетки. Их фенотип отличается от таковых в

периферической крови. У них отсутствует не только CD16, но и KIR рецептор, равно как и NKp30, CD8, CD62L, CCR7. Изолированные из вторичного лимфоидного органа NK-клетки не проявляют признаков цитотоксичности, однако культивирование этих клеток вместе с IL-2 не только изменяет фенотип NK-клеток, но и вызывает цитотоксическую активность [192-194].

NK-клетки активно взаимодействуют с другими клетками иммунной системы. Например, клетки CD56^{bright} контактируют с дендритными клетками во вторичных лимфоидных органах, после такого контакта возможны несколько вариантов развития событий. Так дендритные клетки стимулируют NK-клетки при помощи IL-12, IL-15, IL-18 и интерферона первого типа [195]. In vitro было показано, что IL-12 и 18 индуцируют выработку IFN- γ NK-клетками, то есть увеличивает их цитотоксическую активность [196]. Важную роль играют межклеточные контакты. Так при взаимодействии дендритных и NK-клеток образуется синапс, происходит перестройка цитоскелета, активируются липидные рафты [197]. Также было показано, что при соотношении NK-клетки-дендритные клетки (1:5) происходит дифференцировка последних, но при соотношении (5:1) незрелые дендритные клетки подвергаются цитолизу со стороны NK-клеток. Важно, что цитоллиз не затрагивает зрелые, дифференцированные клетки [198]. Регуляторные Т-клетки могут снижать цитотоксичность NK-клеток путем ингибирования рецептора NKG2D с помощью TGF- β [199]. В свою очередь, NK-клетки регулируют развитие Т и В-лимфоцитов в лимфатических узлах. Так NK-клетки мигрируют в лимфатические узлы, используя CD62L, где они не только индуцируют пролиферацию Th1 лимфоцитов при помощи TGF- β , но и осуществляют киллинг активированных Т-лимфоцитов, пока те еще не экспрессируют достаточное количество классических и неклассических молекул MHC I [200]. NK-клетки также могут подавлять активность В-лимфоцитов, когда те служат причиной аутоиммунных реакций [201].

В периферической крови человека можно выделить две ключевых субпопуляции NK-клеток. Главным фенотипическим критерием для их разделения служит молекула CD56. Большинство клеток периферической крови обладает фенотипом CD56^{dim}CD16⁺, они также обладают широким репертуаром KIR-рецепторов. Минорная субпопуляция обладает фенотипом CD56^{bright}CD16^{dim/-}. Эти NK-клетки характеризуются низкой цитотоксической активностью, которую они компенсируют более сильной продукцией цитокинов, например, IFN- γ . CD56^{bright} NK-клетки также экспрессируют c-kit и обладают высокой аффинностью к IL-2. У CD56^{dim} она много ниже [202, 203]. Также было показано, что теломеры CD56^{dim} NK-клеток периферической крови короче, чем у CD56^{bright} NK-клеток. CD56^{bright} NK-клетки

составляют 90% всех NK-клеток в лимфатических узлах, в то время как в периферической крови на долю $CD56^{dim}CD16^{+}$ NK-клеток приходится 95% от всех $CD3^{-}CD56^{+}$ клеток [204].

Таким образом, NK-клетки в организме человека представляют чрезвычайно гетерогенную популяцию. Фенотип клетки зависит от условий микроокружения, в которых происходила ее дифференцировка. В свою очередь, фенотип NK-клеток определяет их функциональные особенности. Поэтому, когда мы говорим о роли NK-клеток при беременности, важно понимать о какой именно субпопуляции клеток идет речь (Рисунок 6).

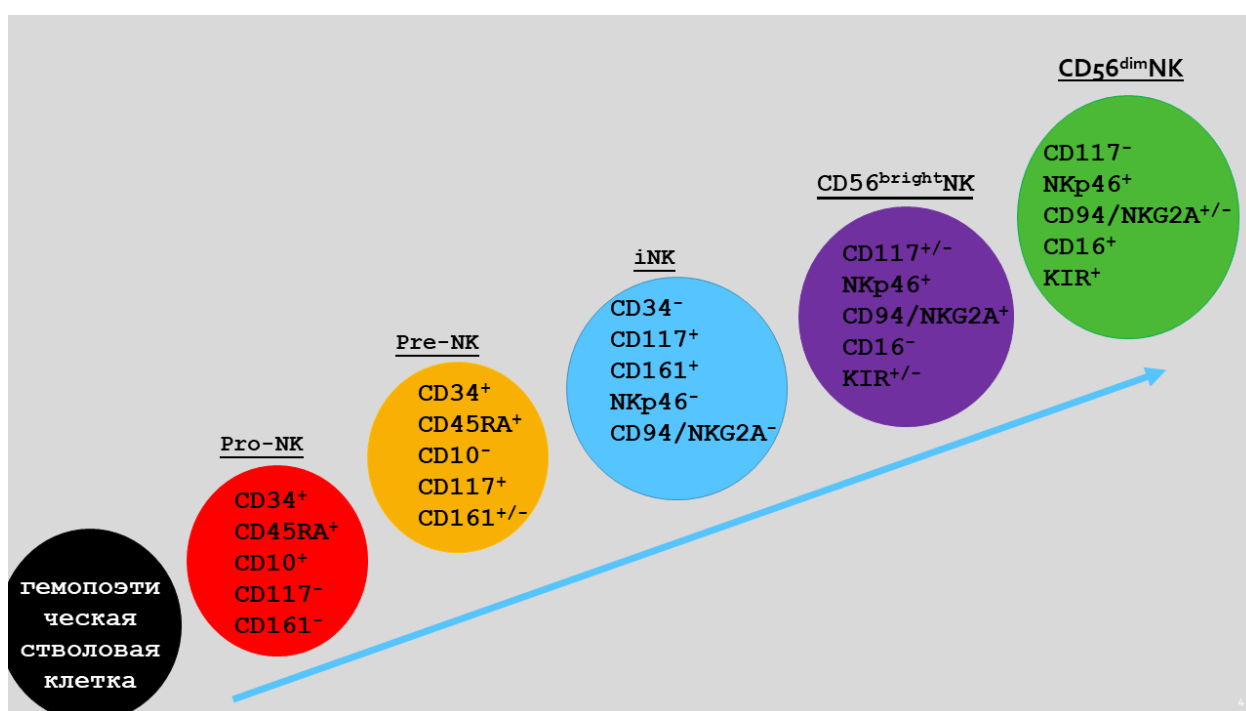


Рисунок 6. Этапы дифференцировки NK-клеток

3.4. Вклад NK-клеток в физиологическую беременность.

Во время беременности важнейшую роль играют NK-клетки, расположенные в матке – NK-клетки матки (uterine NK-cells). В свою очередь, в ней можно выделить две группы клеток: децидуальные NK-клетки и эндометриальные NK-клетки. С одной стороны, эти две субпопуляции весьма схожи по своим фенотипическим характеристикам, однако последние исследования показали ряд различий. Так пролиферация эндометриальных NK-клеток напрямую зависит от фазы менструального цикла, пролиферация усиливается по мере перехода от пролиферативной к секреторной. В результате успешного оплодотворения пролиферация усиливается, в противном случае NK-клетки погибают в течение 24-48

часов.[205] На сегодняшний день, репертуар поверхностных маркеров эндометриальных клеток включает CD56⁺, CD3⁻, CD16⁻, CD94⁺, CD9⁺, CD57⁻, HLA-DR⁺, CD69⁺, CD158b⁺, NKB1⁺, and L-selectin⁻. [206].

До сих пор остается актуальным вопрос о пополнении пула децидуальных NK-клеток. На сегодняшний день существует три основных теории: дифференцировка децидуальных NK-клеток из эндометриальных NK-клеток, развитие децидуальных NK-клеток из гематопоетической стволовой клетки предшественницы, миграция периферических NK-клеток в зону маточно-плацентарного контакта.

Тот факт, что количество эндометриальных NK-клеток возрастает при беременности свидетельствует в пользу первой теории. Однако, показано что во время беременности возрастает и общее число клеток иммунной системы в области эндометрия, а NK-клетки составляют лишь 30% от их числа [207]. Стоит еще раз отметить, что эндометриальные NK-клетки обладают свойствами характерными как для CD56^{bright}, так и для CD56^{dim} NK-клеток периферической крови. Как и первые они экспрессируют CD56, CD57, CD94. Также они несут NKB1 (KIR3DL1), CD158b (KIR2DL2/3), характерные для CD56^{dim} [208]. Более того, они экспрессируют такие активационные рецепторы как HLA-DR и CD69 [209]. С одной стороны, NK-клетки снижают экспрессию CD16 и увеличивают экспрессию NKp46, NKG2D (как и децидуальные NK-клетки), но в отличие от децидуальных NK-клеток у них снижается экспрессия NKp30 и NKp44 [207]. Важной особенностью эндометриальных NK-клеток является их крайне низкая цитотоксичность (<20%), не смотря на наличие у них перфорины [210]. Они также не продуцируют IFN- γ , IP-10, VEGF, PLGF [207]. Однако, в присутствии IL-15 эндометриальные NK-клетки активируются, а при последующем добавлении IL-12, начинают секретировать IFN- γ и IP-10 [85, 207]. Эндометриальные NK-клетки приобретают способность к продукции VEGF при их кокультивировании с IL-2, тем самым способствуя процессам ангиогенеза [211]. Однако, было показано, что IL-2 не характерен для данной ткани, а значит не может выступать в качестве активатора [212]. Суммируя эти данные, можно смело сказать, что эндометриальные NK-клетки представляют отдельную субпопуляцию NK-клеток. Отсутствие на NK-клетках хемокиновых рецепторов, включая CXCR1, 2,3,4, CCR1,2,3,5,7, позволяет предположить, что эти клетки появились в эндометрии не путем миграции клеток периферической крови, а в ходе дифференцировки стволовой клетки предшественницы [207]. Сниженная экспрессия на эндометриальных NK-клетках NKp30 и NKp44 рецепторов, отсутствие цитотоксической и секреторной функций, свидетельствуют о том, что эти клетки находятся в неактивированном состоянии. Потому некоторые авторы предлагают гипотезу, согласно

которой эндометриальные NK-клетки дифференцируются в децидуальные в присутствии IL-15 [74, 207, 213]. В эксперименте с мышинными эндотелиальными клетками NK1.1⁺ было показано, что изначально эти клетки экспрессировали крайне мало B220 (CD45R) и ICOS (CD278), но после активации их IL-15 экспрессия B220 и ICOS увеличивалась. Стоит отметить, что данный эффект нельзя полностью адресовать IL-15, так как в эксперименте присутствовали и другие клетки эндометрия [214].

В ходе эксперимента по пересадке человеческого эндометрия мышам линии NOD/SCID/ γ^{null} (иммунодефицит, отсутствует активность Т, В, NK-клеток) было показано, что у последних возрастало количество NK-клеток к 28 дню менструального цикла.[215] Это говорит в пользу гипотезы о дифференцировке децидуальных NK-клеток из местной гематопозитической стволовой клетки. Кроме того, на некоторых децидуальных NK-клетках отсутствуют хемокиновые рецепторы, следовательно, эти клетки не могли мигрировать из периферической крови и скорее всего, образовались именно путем [212] указанным выше [213, 216].

Третий способ пополнения пула децидуальных NK-клеток – миграция NK-клеток периферической крови. Как указывалось, выше, NK-клетки обладают всеми необходимыми молекулами для миграции через эндотелиоциты. Однако, теперь на первое место выходят хемокины, на которые мигрируют NK-клетки и их рецепторы к ним. Важным остается вопрос о процессе дифференцировки NK-клеток периферической крови в децидуальные. Так было предложено, что децидуальные NK-клетки образуются в результате дифференцировки периферических CD56^{dim}CD16⁺ клеток в присутствии TGF β [217]. Другие исследователи считают, что в качестве предшественников выступают CD56^{bright}CD16⁻. В отличие от CD56^{dim}CD16⁺ они экспрессируют куда больше L-селектина, который необходим для прикрепления к ВЭВ и дальнейшей миграции [125]. В пользу этой теории выступает и тот факт, что лиганд L-селектина – CSPG-2 активно вырабатывается тканями в течение секреторной фазы менструального цикла [218]. Важную роль в миграции NK-клеток в децидуальную область играет CXCL12 (SDF-1, stromal cell-derived factor-1) [216, 219]. Так, CD56^{bright}CD16⁻ несут на своей поверхности много CXCR4 (рецептор к SDF-1). Стоит отметить, что одним из основных производителей SDF-1 при беременности является инвазивный трофобласт первого триместра [216]. Пологают, что трофобласт также может привлекать CD56^{bright} при помощи MIP1- α (macrophage inflammatory protein 1 α). Более тщательный анализ хемокиновых рецепторов, представленных на CD56^{bright}CD16⁻ (децидуальные NK-клетки), CD56^{bright}CD16⁻ (периферические NK-клетки), CD56^{dim}CD16⁺ (периферические NK-клетки) дал следующие результаты. Для CD56^{bright}CD16⁻ характерна

высокая экспрессия CXCR3, причем на периферических NK-клетках этот рецептор экспрессируется гораздо сильнее, в прочем остальные рецепторы: CCR1 (CD191) (связывается с CCL3 или MIP1- α ; CCL5 или RANTES; CCL7 или MCP-3; CCL23 или MIP1-1), CCR9, CXCR4 больше представлены на поверхности децидуальных NK-клеток. В свою очередь, на CD16⁺ NK-клетках сильнее экспрессируется CXCR1, лигандом для которого выступает IL-8.[220] Особый интерес представляет CXCR3, так как к нему в качестве лигандов выступают IP-10 (interferon gamma-induced protein 10) и I-TAC (interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant). IP-10 и I-TAC это хемоаттрактанты, которые секретирует децидуальная ткань. Рассматривается следующая модель: в первом триместре беременности с повышением уровня прогестерона децидуальные клетки начинают секретировать фракталкин (CX3CL1), MCP-1 (CCL2) и IP-10, что приводит к аккумуляции NK-клеток.[221] Затем основные цитокины NK-клеток IFN- γ , TNF- α , IL-1 β (некоторые из них также секретируют макрофаги) стимулируют продукцию вышеуказанных хемокинов, что приводит к миграции CD56^{bright}CD16⁻ NK-клеток [216, 220]. Анализ фенотипических и физиологических особенностей NK-клеток показал, что, как и эндометриальные клетки, они представляют уникальную субпопуляцию [222]. Предположения о том, что мигрировавшие CD56^{bright}CD16⁻ NK-клетки подвергаются дальнейшим модификациям, подтвердились. Так в присутствии продуктов секреции децидуальных клеток (в частности IL-15) клетки периферической крови приобретали набор хемокиновых рецепторов, характерных для децидуальных NK-клеток [216]. Кроме того, сами NK-клетки стимулируют выработку IL-15, воздействуя на децидуальные клетки IFN- γ [223].

Важной частью ангиогенеза и беременности в целом является гипоксия. В условиях гипоксии происходит выработка HIF-1 (индуцируемый при гипоксии фактор 1), который не только способствует формированию у клеток устойчивости к гипоксии, но и стимулирует выработку эритропоэтина и VEGF (в том числе и периферическими NK-клетками) [224]. Также было показано, что в условиях гипоксии увеличивается количество CD56^{bright} CD16⁻ NK-клеток в периферической крови. Более того, гипоксия усиливала эффект TGF- β [225].

Суммируя, складывается впечатление, что для пополнения пула децидуальных NK-клеток применяются все вышеуказанные механизмы. Возможно, такая гетерогенность объясняет и природу децидуальных NK-клеток, вобравшую в себя часть свойств и функций как от CD56^{bright}CD16⁻, так и от CD56^{dim}CD16⁻.

Децидуальные NK-клетки экспрессируют маркеры характерные как для CD56^{dim}CD16⁺, так и для CD56^{bright}CD16⁻. Для большинства децидуальных NK-клеток характерен фенотип

CD56^{bright}CD16⁻, но в отличие от периферических CD56^{bright}CD16⁻ децидуальные экспрессируют KIR рецепторы, для которых в качестве лигандов выступают HLA-1 молекулы трофобласта. KIR2DS1, KIR2DL1, KIR2DS2, KIR2DL2/3 связываются с HLA-C; KIR2DL4, ILT2 связываются HLA-G; CD94/NKG2A/B, CD94/NKG2C связываются с HLA-E; CD160 связывается с HLA-C и HLA-G [212].

Главную роль во время беременности все же играют децидуальные NK-клетки. У клеток с фенотипом CD56^{hi}CD16⁻ сильней выражена экспрессия рецепторов семейства CD94/NKG2, в то время как для клеток периферической крови характерны рецепторы семейства KIR [226]. Однако, при беременности, уровень экспрессии этих рецепторов децидуальными NK-клетками возрастает. Конкретно, усиливается экспрессия KIR2D рецептора, лигандом для которого выступает молекула HLA-C [227]. В свою очередь, именно трофобласт экспрессирует высокие уровни HLA-C. [228] Система KIR/HLA-C является основополагающей в системе трофобласт-NK-клетки, особенно в первые недели беременности. Еще одним способом коммуникации между NK-клетками и клетками трофобласта является экспрессия последними молекул HLA-E. За распознавание этой молекулы отвечают такие рецепторы NK-клеток как: CD94/NKG2A (активирующий) и CD94/NKG2C(ингибирующий) [229]. В качестве очередного фактора, ингибирующего цитотоксичность NK-клеток по отношению к клеткам трофобласта выступают молекулы HLA-G (неклассические молекулы МНС-I, характерные только для трофобласта). Они связываются с ILT2 рецептором NK-клеток (ингибирующий) и KIR2DL4 (структура отличается от остальных KIR2DL рецепторов, обладает как активирующим, так и ингибирующим действием) [230]. Долгое время постулировалось, что молекулы HLA-G – ключевой элемент, обеспечивающий иммунологическую толерантность в системе мать-плод. Однако, последние эксперименты показали, что молекулы HLA-G угнетают цитотоксическую активность Т-лимфоцитов (уменьшают их пролиферацию, вызывают апоптоз), в то время как с NK-клетками все обстоит несколько иначе. [231] С одной стороны 2DL4 запускал у покоящихся NK-клеток секрецию IFN-γ, но не усиливал их цитотоксическую активность [232]. Незначительное усиление цитотоксичности отмечалось у NK-клеток, активированных IL-2, и у клеточных линий [233]. Данная двойственность объясняется тем, что связывание молекул HLA-G и 2DL4 происходит в эндосомах NK-клеток, там же находится большая часть 2DL4 рецепторов [234]. Таки образом, согласно последним данным, HLA-G, в отличии от HLA-C и HLA-E отвечает не за ингибирование цитотоксической активности NK-клеток, а за их репрограммирование. Действительно, после связывания растворимой формы HLA-G, NK-клетками начинали активно продуцировать

провоспалительные цитокины (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-6, IL-8) [235, 236]. Таким образом, эндосомная передача сигнала – это обходной путь, позволяющий NK-клеткам начать синтез провоспалительных цитокинов, минуя цитотоксический ответ на клетки трофобласта.

Также на децидуальных NK-клетках сильней экспрессируются молекулы CD9, галектин, интегрин альфа -1 и другие адгезионные молекулы. [222] NKp46, NKp30, NKp44 NKG2D, DNAM-1, экспрессируются примерно на том же уровне. Также децидуальные NK-клетки содержат гранулы с перфорином, гранзимом (больше чем периферические CD56^{bright}CD16⁻) [15, 237].

Несмотря на наличие всего необходимого, NK-клетки показывают очень слабую цитотоксичность. Это объясняется в первую очередь действием молекул HLA, которые связываются с ингибирующими рецепторами NK-клеток. Отмечена роль 2B4 (CD244) в снижении цитотоксичности децидуальных NK-клеток [238].

Роль децидуальных NK-клеток при беременности особенно велика в первом триместре. С одной стороны, NK-клетки должны обеспечить инвазию трофобласта (подготовить децидуальные клетки, обеспечить секрецию цитокинов необходимых для стимуляции инвазии), с другой стороны, задача NK-клеток также состоит в предотвращении чрезмерной инвазии трофобласта. Показано, что NK-клетки взаимодействуют со спиральными артериями раньше клеток экстравилезного трофобласта. Так при кокультивировании NK-клеток и спиральных артерий миометрия на последних обнаружили следы деструкции [239]. Децидуальные NK-клетки продуцируют ряд цитокинов и хемокинов: TGF- β , IFN- γ , GM-CSF, VEGF-C, PLGF, IL-1 β , IL-6, IL-8, IP-10, MIP-1a, CSF-1, лейкоингибирующий фактор (LIF), ангиопоэтины-1 и -2 (Ang-1, Ang-2)

Итак, во время беременности образуется уникальная популяция NK-клеток – децидуальные NK-клетки. Происхождение этой популяции неоднозначно и, вероятно, включает в себя несколько механизмов.

4. Клетки трофобласта.

Клетки трофобласта – основные игроки в зоне маточно-плацентарного контакта со стороны плода. Клетки трофобласта принимают непосредственное участие в инвазии трофобласта, ангиогенезе. Трофобласт активно действует на свое микроокружение, меняя клетки вокруг.

4.1. Особенности фенотипа и функции трофобласта.

Изучение трофобласта всегда сталкивалось с рядом этических и методологических сложностей, что ограничивает наши знания о клетках трофобласта, особенно на ранних этапах беременности, когда клетки трофобласта дают начало клеткам трофобласта. Существуют протоколы, которые позволяют изолировать первичный трофобласт из плаценты первого триместра, но такие клетки быстро дифференцируются и перестают пролиферировать в системе *in vitro*. В качестве маяков для обнаружения клеток трофобласта *in vivo* выступает их анатомическое расположение и экспрессия ряда маркеров [240].

Существует два главных пути дифференцировки клеток трофобласта в плаценте: ворсинчатый и вневорсинчатый трофобласт. Ворсинчатый трофобласт образует синцитиотрофобласт, а вневорсинчатый трофобласт позже дифференцируется в эндovasкулярный и интерстициальный, клетки которого будут проникать глубоко в сосуды и строму децидуальной ткани соответственно. Отличительная особенность клеток трофобласта – наличие на их поверхности репертуара молекул МНС-I. Ворсинчатый и синцитиотрофобласт несут молекулы HLA-I null. Клетки вневорсинчатого трофобласта экспрессируют HLA-C, HLA-E и HLA-G (уникальна для клеток трофобласта) [241].

В качестве классических маркеров клеток трофобласта выступает цитокератин 7 (KRT7 – белок промежуточных филаментов), HLA-G, хорионический гонадотропин. Однако, не все клетки несут эти маркеры на своей поверхности. В качестве дополнительного маркера иногда используется ELF5 – транскрипционный фактор, который экспрессируется в стволовых клетках трофобласта у мышей, гиперметилирован в клетках вневорсинчатого трофобласта, гипометилирован в стволовых клетках трофобласта. В тканях плаценты человека промоутер ELF5 гипометилирован, что может служить в качестве дополнительного маркера для обременения клеток трофобласта. Однако, уникальность и специфичность данного маркера до конца не изучена [242]. Еще одним кандидатом для определения клеток трофобласта выступают некодирующие микроРНК (miRNAs), гены которых собраны в кластер 19miRNA (C19MC), расположенный на хромосоме 19q13.41. Этот кластер генов специфичен для приматов, в норме экспрессируется только в плаценте и эмбриональных клетках человека [243].

4.2. Способы защиты клеток трофобласта от иммунной системы матери, примеры кооперации.

Первая концепция, попытавшаяся описать взаимодействие матери и плода, была предложена более 50 лет назад Сэрм Питером Медавара. В ней говорилось о том, что

задача иммунной системы свести на нет иммунный ответ. Только так можно было объяснить, почему плод, содержащий отцовские гены, не отторгается. В дополнение к этой концепции была сформулирована следующая – «Th2 или противовоспалительная» теория. Сначала на животной модели было показано, что после иммунизации животных с помощью аллогенных Т-лимфоцитов, у них отмечалось повышение фето-плацентарной выживаемости. С другой стороны, блокирование Т-лимфоцитов с помощью моноклональных антител приводило к уменьшению размеров плаценты, рассасыванию плода. Стало понятно, что Т-лимфоциты регулируют взаимодействие между матерью и плодом. В качестве механизма было предложено рассмотреть цитокины, которые продуцируют эти клетки. Сформировалось мнение, что при беременности иммунная система матери отказывается от клеточно-опосредованного иммунного ответа в пользу гуморального. Прослеживалась аналогия с балансом Th1 и Th2 лимфоцитами. Было показано, что при беременности равновесие смещается в сторону Th2 лимфоцитов. В пользу этого говорил и спектр, продуцируемых ими цитокинов. Так цитокины, продуцируемые Th1 лимфоцитами IL-2 и IFN- γ нежелательны при беременности. IFN- γ активирует цитотоксические Т-лимфоциты и NK-клетки, он также ингибирует продукцию GM-CSF, который стимулирует рост клеток трофобласта [244].

Однако, позже стало понятно, что предложенная концепция не осуществима на первых этапах беременности (имплантации, плацентации, в первом триместре и в начале второго триместра). На этих этапах мы видим классическую модель воспалительного процесса. Преобладают Th1 цитокины: IL-6, IL-8, TNF α , IP-10. Повышаются концентрации цитокинов, отвечающие за активацию и миграцию клеток иммунной системы: IL-15, MIP-1B, CX₃CL1. IL-15 способствует снижению цитотоксической активности NK-клеток, которые в свою очередь регулируют инвазию трофобласта с помощью IL-8, CCL8, CXCL1. Также в начале беременности активно идут апоптотические процессы, в ходе которых гибнут клетки трофобласта, клиренс которых осуществляют децидуальные макрофаги.

Еще один важный этап беременности, требующий воспалительного микроокружения – образования трофобласт-эпителиального синапса. Адгезию трофобласта здесь контролируют интегрины, которые связываются фибронектином, витронектином, тромбоспондином и образуют мост между трофобластом и эпителием матки. Уровень экспрессии адгезионных молекул зависит от провоспалительных цитокинов, которые секретируют как эндометриальные клетки, так и клетки иммунной системы. Провоспалительные цитокины также индуцируют синтез ADAM17 (фермент металлопротеаза, относящаяся к семейству металлопротеаз ADAM). Основная задача

ADAM17 сводится к отщеплению мембранного фрагмента TNF, после чего он становится растворимым цитокином. Однако, во время беременности он отвечает за расщепление муцина 1. MUC1 – карбогидрат, расположенный на поверхности материнского эпителия. Муцин 1 – карбогидрат, который предотвращает адгезию бластоцисты. MUC1 делает это за счет длинного цитоплазматического домена, который состоит из по 20 аминокислот, насыщенные серином. Единственное место, куда она может сесть – участок, с которого MUC1 счистили специальные металлопротеазы. Как показали исследования, ни изменения pH, ни критические температуры не могут отсоединить MUC1 от мембраны. Именно ADAM17 вносит разрез, отсоединяет цитоплазматический домен, подготавливает площадку для имплантации.

В организме человека триптофан может использоваться для получения ряда метаболитов. Часть его перерабатывается в серотонин (1%) для нервной системы, часть в мелатонин. В основном (>95%) он расщепляется до никотинамидадениндинуклеотида (NAD) по кинурениновому метаболическому пути. Иницирующим/лимитирующим этапом в этом каскаде является расщепление кольца пиррола с преобразование триптофана в кинуренин. В этом принимают участие два фермента: триптофан 2,3-диоксигеназа (TDO) и индоламин-2,3-диоксигеназа (IDO). Во время воспалительной реакции активность IDO усиливается (в ответ на IFN- γ или связывания TLR с лигандом). На молекулярном уровне контроль осуществляется через JAK-STAT путь и NF κ B. Важно помнить, что экспрессия клетками IDO не означает его активность. IDO гликопротеин содержит гем-простетическую группу (Fe^{3+}), только после ее перехода в активную (Fe^{2+}) форму, IDO активируется. Для этого перехода необходим окислитель (например, супероксид), что в очередной раз показывает зависимость активности IDO от микроокружения и его связи с воспалением. Индоламин-2,3-диоксигеназа – триптофан-катаболизирующий фермент, который через кинурениновый сигнальный путь подавляет T-клеточно-опосредованный иммунологический надзор, часто применяется опухолевыми клетками для избегания иммунного надзора. На сегодняшний день главенствует теория, по которой различные антигенпрезентирующие клетки макрофаги, дендритные клетки, клетки синцитиотрофобласта (для которых недавно были описаны свойства антигенпрезентации) экспрессируют IDO, который продуцирует метаболиты триптофана, которые в свою очередь осуществляют иммунносупрессию. Использование сред без триптофана показало, что в клетках происходил остановка клеточного цикла, они становились чувствительней к апоптозу. Клетки, которые сами синтезируют IDO для защиты используют специальный фермент триптофан-тРНК-синтазу, которая образует триптофан-тРНК комплекс. Этот

комплекс защищен от разрушения (IDO) и нарабатывает резервный триптофан в доступной для синтеза белка форме. Ряд исследований показал, что разные метаболиты триптофана оказывают избирательный эффект на клетки иммунной системы. Так 3-гидрокси антранил оксид индуцирует апоптоз у Th1, но не Th2 лимфоцитов. Предполагается, что апоптоз запускается по Fas-зависимому пути. Кинуренин и 3-гидроксикинуренин цитотоксичны по отношению к В-лимфоцитам и NK-клеткам. В пользу этого также говорят исследования с использованием ингибитора IDO (1-метил-триптофан), которые приводили к стремительному отторжению плода из-за действия Т-лимфоцитов. Снижение триптофана с помощью IDO также способствует борьбе с бактериальными и паразитическими инфекциями [245].

Стоит отметить, что подобное действие IDO свойственно не только зоне маточно-плацентарного контакта. Так в желудочно-кишечном тракте большинство АПК клеток в пейеровых бляшек секретируют IDO. Это помогает нивелировать aberrantный ответ Т-лимфоцитов на антигены пищевой природы и собственные антигены. IDO также секретируют клетки роговицы и передней камеры глаза. Рекордсменами по продукции IDO являются эпителиальные клетки мочеполовых путей. Считается, что здесь главная задача IDO – снижение количества триптофана, следовательно, создание неблагоприятной среды для бактерий (*Toxoplasma gondii*, *Chlamydia*).

За последнее время все больше исследователей предлагают механизмы, с помощью которых трофобласт обеспечивает толерантность иммунной системы матери по отношению к себе. Эта анрегия получила название периферической толерантности.

Один из механизмов основан на экспрессии синцитиотрофобластом молекул HLA-G. Мало того, что клетки синцитиотрофобласта обладают низким уровнем экспрессии классических молекул МНС I, они несут на своей поверхности неклассические молекулы HLA-G, которые связываются с ингибирующим рецептором на поверхности NK-клеток, снижая их цитотоксическую активность (Рисунок 7А) [246].

Материнский эндометрий, а позже Th2 клетки синтезируют фактор ингибирующий лейкемию (LIF, leukemia inhibitory factor), в свою очередь клетки синцитиотрофобласта экспрессируют LIF-R. Взаимодействие LIF/LIF-R индуцирует рост и дифференцировку клеток трофобласта. Секреция LIF усиливается в присутствии прогестерона, который секретируют клетки плаценты (Рисунок 7В) [247].

Еще один механизм на вооружении клеток трофобласта – CD95/CD95L (Fas/FasL). Этот апоптотический путь широко применяется клетками иммунной системы (NK-клетки,

Th1 клетки, цитотоксические Т-лимфоциты) вовремя лимфо- и иммунного ответа, борьбе с опухолевыми клетками. Клетка-мишень несет на своей поверхности CD95, а иммунная клетка с помощью CD95L индуцирует в ней каскад апоптоза. Было показано, что клетки трофобласта экспрессируют CD95, что позволяет клеткам иммунной системы сдерживать инвазию трофобласта и контролировать его рост. Однако, позже было продемонстрировано, что клетки трофобласта также синтезируют CD95L и могут элиминировать клетки иммунной системы (Рисунок 7B) [248].

Аннексин II – гликопротеин, секретируемый клетками плаценты. Недавние исследования показали, что он также может ингибировать пролиферацию лимфоцитов и секрецию IgG и IgM [249].

Еще один механизм киллинга, который может использовать иммунная система – комплемент. Связавшись с антигеном антитела могут индуцировать каскад комплемента, который приводит к сборке мембраноатакующего комплекса. В клетке-мишени образуется отверстие, она гибнет. Синцитиотрофобласт несет ряд антигенов, которые могут активировать комплемент. Однако, он также обладает рядом сдерживающих факторов:

- Membrane complement protein (MCP) – предотвращает связывание комплемента с антителами.
- Decay accelerating factor (DAF) – разрушает компоненты комплемента (Рисунок 7D) [250]

В последнее время все чаще говорят о способах трофобласта маскировать (камуфлировать) антигены с помощью антиген-специфичных блокирующих антител, фибриноидного материала, сиаломуцинов. Однако, на сегодняшний день эти теории несколько спекулятивны [251, 252].

Таким образом, клетки трофобласта обладают рядом механизмов, направленных на снижение иммунологического ответа матери на них. Важно, что эти механизмы обеспечивают в первую очередь толерантное взаимодействие, так как подавление иммунной системы матери может привести к патологиям.

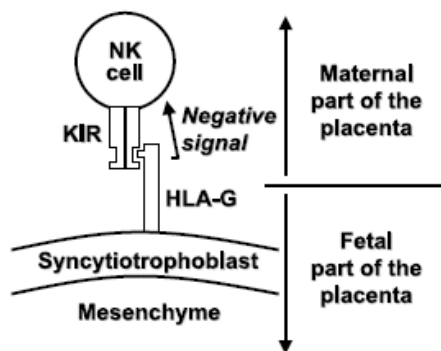


Рисунок 7А. Участие генов локуса HLA-G в защите клеток трофобласта.

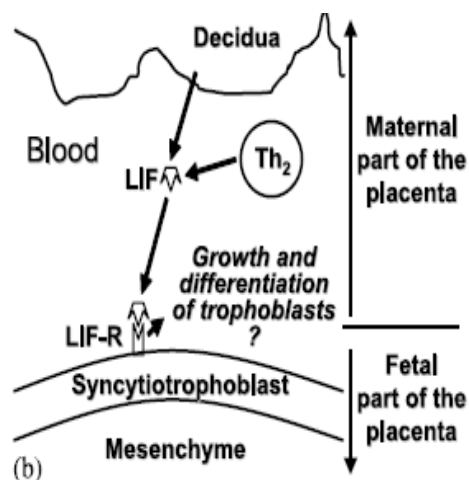


Рисунок 7В. Участие молекул LIF в защите клеток трофобласта.

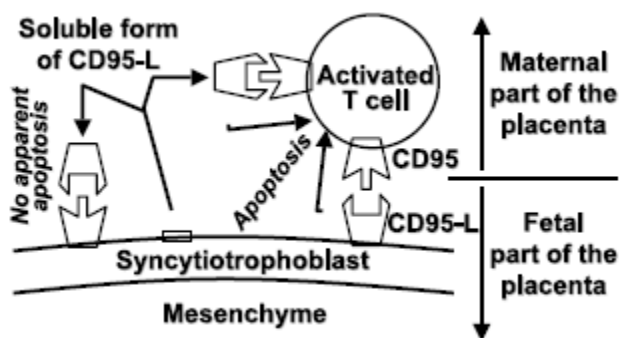


Рисунок 7С. Участие молекул CD95 в защите клеток трофобласта

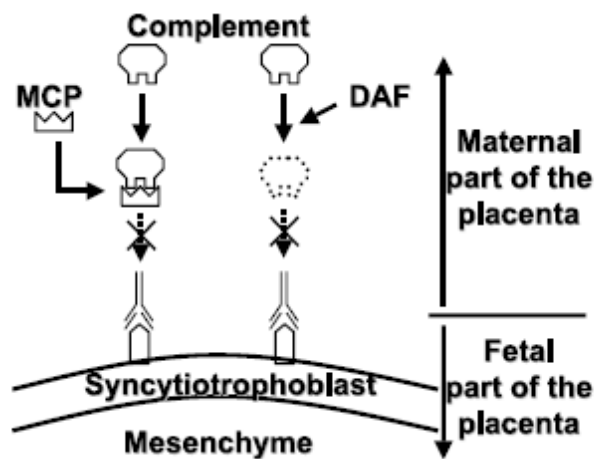


Рисунок 7D. Участие молекул MCP и DAF в защите клеток трофобласта

4.3. Цитотоксическая активность НК-клеток в отношении клеток трофобласта.

Взаимодействие НК-клеток и клеток трофобласта всегда вызывало большой интерес. Особенно, цитотоксическое действие НК-клеток. Так, в одной из первых работ было показано, что в отличие от клеток линии K562 клетки трофобласта первого триместра не вызывают цитотоксического ответа у НК-клеток, полученных как из децидуальной

оболочки первого триместра, так и из периферической крови [253]. Дальнейшие исследования показали, что клетки трофобласта не снижали гибель клеток линии K562. Также было показано, что в отличие от клеток линии K562 клетки трофобласта не образовывали контакта с NK-клетками [254].

Позже в качестве главных протективных механизмов для клеток трофобласта были предложены молекулы HLA-G и HLA-E. Также в качестве модели клеток трофобласта стали применять клетки линии JEG-3. В результате этих исследований стали появляться и первые разногласия. Так несмотря на то, что молекулы HLA-G снижали гибель клеток линии K562, блокирование рецептора к этой молекуле (CD94/NKG2) не приводило к увеличению гибели клеток линии JEG-3. Появились предположения о том, что клетки трофобласта могут избегать цитотоксической гибели, используя механизмы кроме неклассических HLA молекул. Также было показано, что цитотоксическая активность NK-клеток, активированных с помощью IL-2, сильно отличается от неактивированных NK-клеток [255].

Дальнейшие исследования были сфокусированы на механизмах взаимодействия рецепторов NK-клеток и молекул HLA на поверхности клеток трофобласта. Последние были представлены молекулами HLA-G, HLA-C и HLA-E. В свою очередь, рецепторы NK-клеток, распознающие эти молекулы, входили в три семейства: CD94/NKG2 гетеродимеры, KIR и ILT. Представители первого семейства CD94/NKG2A и C связываются с молекулой HLA-E, что любопытно, CD94/NKG2A – ингибирующий рецептор, а CD94/NKG2C – активирующий. Также было показано, что децидуальные NK-клетки экспрессируют CD94/NKG2A в пять раз сильнее, чем NK-клетки периферической крови. Также децидуальные NK-клетки отличались повышенной экспрессией KIR2D рецепторов специфичных к HLA-C. Рецептор к молекуле HLA-G долгое время не удавалось детектировать. Наконец, было показано, что с ним могут связываться ILT2 и ILT4. Еще большей специфичностью к HLA-G обладал KIR2DL4 [256]. На клеточной линии TEV-1 было показано, что ингибирование HLA-G приводит к усилению цитотоксической активности NK-клеток в отношении к этой клеточной линии [257]

Со временем сформировалось мнение о цитотоксической активности NK-клеток в отношении клеток трофобласта, как о негативном факторе, а главная задача клеток трофобласта – защита. Действительно, с повышенной цитотоксичностью NK-клеток связан ряд заболеваний [258]. Однако, цитотоксичность NK-клеток во время беременности носит физиологический характер и необходима для многих процессов, например, последние

исследования показывают важную роль децидуальных NK-клеток в защите от цитомегаловирусной инфекции [259].

Хотелось бы отметить, что клетки трофобласта также не безобидны. Так они индуцируют гибель гладкомышечных клеток через TRAIL рецепторы, секретируют FasL, а недавние исследование показали наличие у них антимикробного пептида – кателицидина [260, 261].

На сегодняшний день существует немало исследований NK-клеток, клеток трофобласта и их взаимодействий. Цитотоксическое взаимодействие между этими клетками рассматривалось преимущественно с позиции подавления цитотоксической активности NK-клеток по отношению к клеткам трофобласта.

Суммируя все вышесказанное, хотелось бы отметить следующие ключевые пункты:

1. Во время беременности в зоне маточно-плацентарного контакта формируется уникальное микроокружение. Данное микроокружение включает уникальные клеточные популяции, в первую очередь клеток иммунной системы, и цитокиновую сеть.
2. Иммунная система матери вовлечена во все этапы беременности, начиная с оплодотворения и имплантации, заканчивая формированием плаценты и родами.
3. NK-клетки в зоне маточно-плацентарного контакта формируют уникальную субпопуляцию децидуальных NK-клеток. Эти клетки отличаются своими поверхностными маркерами, функциями, тесно взаимодействуют с клетками трофобласта.
4. Цитотоксическое взаимодействие между клетками широко распространено в зоне маточно-плацентарного контакта. Примером может служить цитотоксичность децидуальных NK-клеток по отношению к клеткам трофобласта. Однако, большинство исследований рассматривало этот диалог лишь с одной позиции – подавления цитотоксической активности NK-клеток клетками трофобласта.

IV. Материалы и методы.

1. Культуры клеток, использованные для исследования.

Исследования проводили с использованием клеток трофобласта линии JEG-3, полученными из Американской коллекции типовых культур (ATCC, США). Клетки линии JEG-3 воспроизводят основные морфологические, фенотипические и функциональные характеристики инвазивного трофобласта первого триместра беременности [262]. Для культивирования использовали среду DMEM (Sigma, США) с добавлением 10% инаktivированной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (Sigma, США), 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, 0,5 мМ L-глутамина, 1 мМ МЕМ, 1 мМ пирувата натрия (Sigma, США). Дезинтеграцию монослоя клеток для пересева осуществляли раствором версена (Биолот, Россия) с раствором трипсина (Биолот, Россия), смешанных в соотношении 1:1. Пересев клеток осуществляли каждые 48 часов. Оценивали жизнеспособность клеток с помощью раствора трипанового синего, она составляла не менее 96%.

В ходе исследования также использовали натуральные киллеры (НК-клетки) линии NK-92. Оригинальная линия NK-92 была получена Dr. Gong J.H. (Институт онкологии им. Раш, США) из гранулярных лимфоцитов периферической крови и костного мозга 50-летнего мужчины, страдающего злокачественной неходжинской лимфомой. НК-клетки линии NK-92MI воспроизводят все основные морфологические, фенотипические, функциональные характеристики клеток естественных киллеров [263, 264]. Для культивирования НК-клеток линии NK-92 использовали полную ростовую среду следующего состава: минимальная среда Игла α -модификации (α -modification Minimum Essential Medium, α -MEME) с добавлением 12,5% инаktivированной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) 12,5% инаktivированной лошадиной сыворотки 0,2 мМ мио-инозитола, 0,02 мМ фолиевой кислоты, 2 мМ L-глутамина, 100 мкг/мл стрептомицина, 100 ЕД/мл пенициллина, 20 мМ буфера HEPES, 0,1 мМ меркаптоэтанола («Sigma Aldrich», США). Клетки линии NK-92 – суспензионная культура, требующая пересева 1 раз в 1-2 дня. Клетки культивировали при 37°C во влажной атмосфере с 5% содержанием CO₂. При помощи раствора трипанового синего («Sigma Aldrich», США) оценивали жизнеспособность клеток, при этом она составляла не менее 96%.

2. Культивирование плацент с целью получения секреторных продуктов плацент.

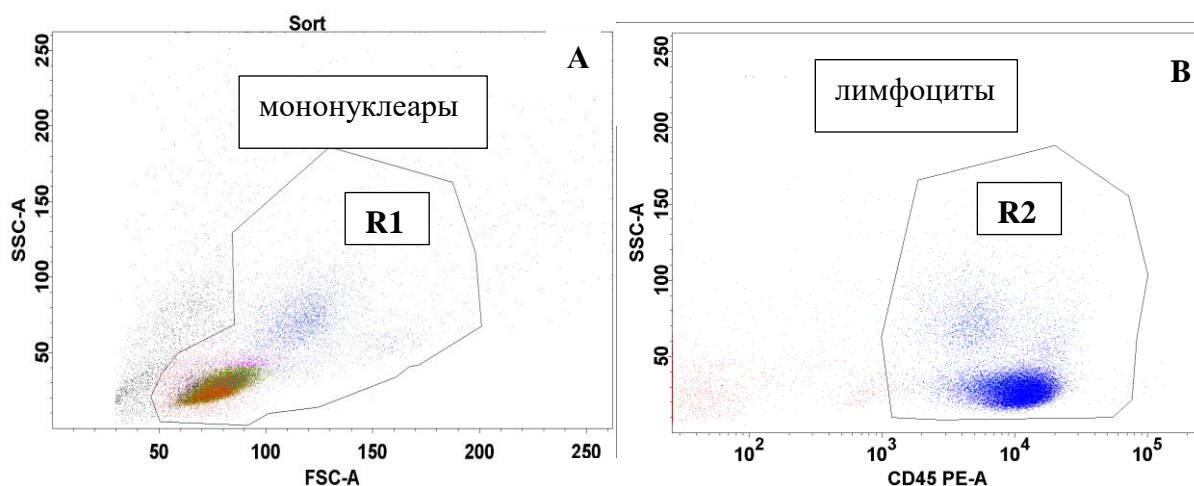
Обследованы плаценты 35 беременных женщин: первую группу составили 20 беременных женщин на сроке 9-11 недель беременности без признаков воспалительной реакции и инфекционных процессов. Вторую группу составили 15 женщин с физиологическим течением беременности на сроке 38-39 недель. Диагноз был установлен в отделении физиологии и патологии беременности ФГБУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта» СЗО РАМН на основании ведущих клинических симптомов. Критериями исключения для беременных II группы являлись: сахарный диабет I и II типов, многоводие, маловодие, миома матки, урогенитальная инфекция, острая инфекция или обострение хронической инфекции, гипертоническая болезнь и органические заболевания системы кровообращения. Группы беременных были сопоставимы по возрасту, паритету родов и акушерскому анамнезу. Средний возраст женщин, включенных в исследование, составил $31,6 \pm 4,2$ года. Ткань хорион на сроке 9-11 недель была получена при искусственном аборте у женщин с физиологическим течением беременности; плаценты женщин с физиологическим течением беременности на сроке 38-39 недель были получены при родоразрешении путем кесарева сечения. Кусочки плаценты брали из центральной ее части, культивировали 24 часа в среде DMEM/F12 («Sigma», США) без добавления эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Полученные кондиционированные среды собирали, замораживали и хранили не более месяца при температуре -20°C до исследования.

3. Растворы цитокинов, использованные для исследования.

Растворы цитокинов готовили на среде DMEM с добавлением 1% ЭТС (Sigma, США): TNF α (препарат «Рефнолин», Латвия; специфическая активность препарата 1Ед – 0,06 нг) в концентрации 10 Ед/мл, 50 Ед/мл, 400 Ед/мл; IFN γ (препарат «Гаммаферон», Латвия) в концентрации 40 Ед/мл, 400 Ед/мл, 1000 Ед/мл; IL-1 β (препарат «Беталейкин», Россия) в концентрации 10 Ед/мл, 100 Ед/мл, 1000 Ед/мл; IL-6 (R&D, США) в концентрации 1 нг/мл, 2,5 нг/мл, 4 нг/мл; IL-8 (R&D, США) в концентрации 1 нг/мл, 10 нг/мл, 100 нг/мл; IL-10 (R&D, США) в концентрации 50 Ед/мл, 100 Ед/мл, 200 Ед/мл; IL-4 (R&D, США) в концентрации 1 нг/мл, 10 нг/мл, 20 нг/мл; VEGF (R&D, США) в концентрации 1 нг/мл, 10 нг/мл, 100 нг/мл; PlGF (R&D, США) в концентрации 1 нг/мл, 5 нг/мл, 20 нг/мл; bFGF (R&D, США) в концентрации 1 нг/мл, 10 нг/мл, 20 нг/мл; TGF β (R&D, США) в концентрации 1 нг/мл, 5 нг/мл, 10 нг/мл, GM-CSF в концентрации 10 нг/мл, 100 нг/мл, 1000 нг/мл (R&D, США). Концентрации были выбраны в соответствии с литературными данными [265].

4. Получение NK-клеток из периферической крови.

Использовали периферическую кровь 34 женщин: контрольную группу составили 13 женщин. Вторую группу составили 11 небеременных фертильных женщин, у которых до момента исследования была физиологически протекающая, беременность с последующими успешными родами. Кроме того, для этой группы применялись те же критерии, что и для контрольной. В третью группу вошли 10 женщин с физиологической беременностью. Периферическую кровь получали венепункцией локтевой вены иглой 16G и собирали в вакуумную пробирку с антикоагулянт гепарин (Vacuette; Greiner Bio-One, Austria). Исследование выполнено согласно Коду Медицинской Этики Всемирной Медицинской Ассоциации (Хельсинская Декларация). Получено информативное согласие пациенток на обследование. План исследования был одобрен Этическим Комитетом ФГБНУ «НИИ АГ и Р им.Д.О.Отта». Из периферической крови доноров выделяли фракцию мононуклеаров, по стандартному протоколу выделения для выделения периферической крови на градиенте плотности Histopaque 1077 (Biolot, Россия). После этого мононуклеары обрабатывали моноклональными в следующей комбинации: анти-CD3(PerCP)+анти-CD45(PE)+анти-CD56(PECy7) (BD, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Для контроля неспецифического связывания использовали изотип-антитела (BD, США). NK-клетки с фенотипом $CD45^{+}CD56^{+}CD3^{-}$ выделяли с помощью клеточного сортера FACS Aria III (BD, США). При анализе в координатах FSC (ось абсцисс) и SSC (ось ординат) контролировали наличие мононуклеаров (Рисунок 8 А). NK-клетки экспрессировали CD45 и CD56, но не CD3 (Рисунок 8 В, С).



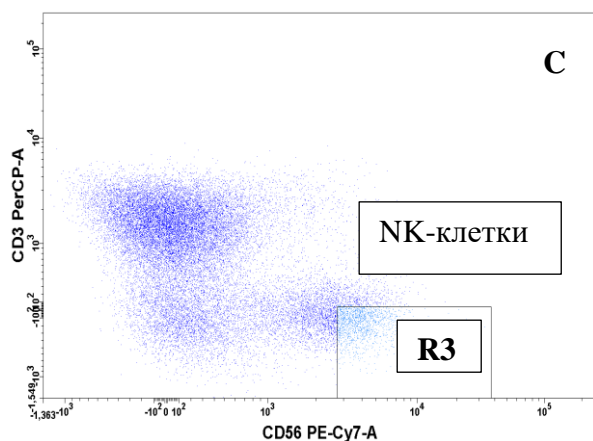


Рисунок 8. А) Двумерная гистограмма в координатах FSC-SSC суспензии клеток. Регион R1 содержит мононуклеары периферической крови. В) Двумерная гистограмма суспензии клеток в координатах FL1 (CD45)-SSC, в которую спроецировали события из региона R1. Регион R2 содержит лейкоциты. С) Двумерная гистограмма суспензии клеток в координатах FL1 (CD56)-FL2 (CD3), в которую спроецировали события из региона R2. Регион R3 содержит NK-клетки.

По завершении клеточного сортинга оценивали его чистоту. Постсорт показал чистоту сортировки выше 99% (Рисунок 9 А, В).

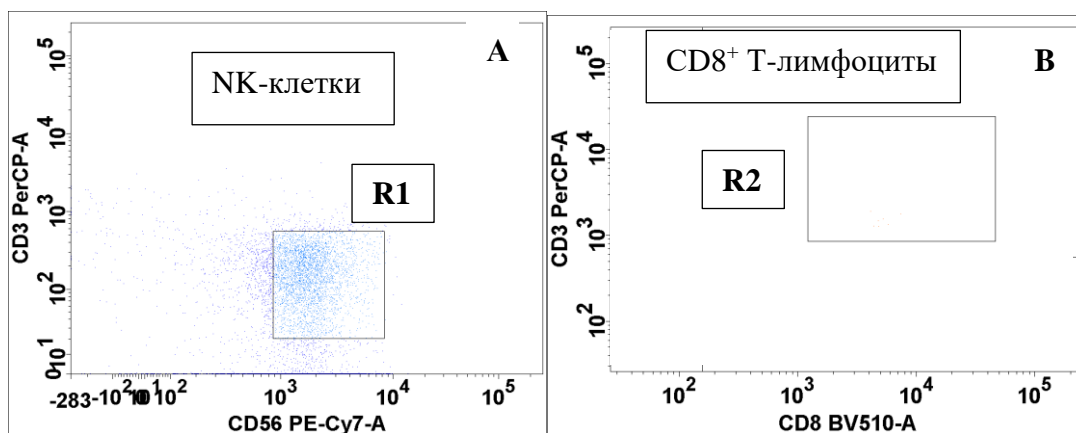
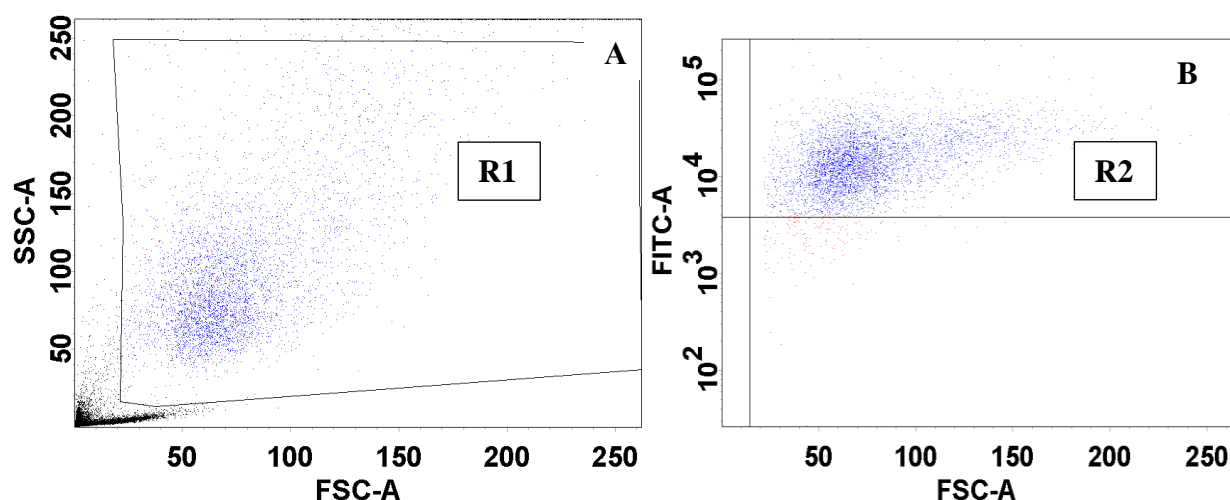


Рисунок 9. А) Двумерная гистограмма суспензии клеток в координатах FL1 (CD56)-FL2 (CD3), регион R1 содержит NK-клетки. В) Двумерная гистограмма суспензии клеток в координатах FL1 (CD8)-FL2 (CD3), регион R2 содержит CD8⁺ Т-лимфоциты.

5. Метод оценки цитотоксической активности NK-клеток линии NK-92 в отношении клеток трофобласта линии JEG-3.

Оценивали цитотоксическую активность NK-клеток линии NK-92 в отношении клеток трофобласта линии JEG-3. Клетки линии JEG-3 сеяли за сутки во флакон для адгезионных клеточных культур площадью 75см³ (BD, США) так, чтобы на следующий день клетки

образовали 70% монослоя. Через 24 часа клетки окрашивали CFSE (Sigma-Aldrich, США). Для этого 4 мкл стокового раствора CFSE (FITC) (4,48 ммоль/л) разводили в 5 мл DMEM и вносили во флакон с клетками линии JEG-3, после чего инкубировали клетки при 37°C, 7%CO₂ в течение 10 минут. Окраску останавливали, отмывая трижды холодной средой DMEM. Окрашенные клетки снимали с подложки помощью раствора версен-трипсина (3:1) (Biolot, Россия) и вносили в лунки круглодонного 96-луночного планшета (BD, США). В каждую лунку добавляли 30.000 клеток в 50мкл среды DMEM. В лунки к клеткам линии JEG-3 добавляли клетки линии NK-92 в соотношении 5:1 и 10:1, в каждую лунку добавляли 150.000 клеток или 300.000 клеток в 100 мкл соответственно. После этого в каждую лунку добавляли IL-2 (75 Ед/150мкл). В полученную смесь в зависимости от цели эксперимента вносили цитокины в различных концентрациях или секреторные продукты плацент. После этого планшет центрифугировали в течение 3 минут 100g, при комнатной температуре. Затем клетки инкубировали 4 часа в термостате 37°C, 5%CO₂. После этого клетки окрашивали в течение 10 минут с помощью Propidium iodide (PI) (Sigma-Aldrich, США), который добавляли в лунки планшета (конечная концентрация 2мкг/мл). Клетки окрашивались в течение 10 минут, 4°C. Подсчет погибших клеток проводили с помощью проточного цитофлуориметра FACS Canto II (BD, США) (Рисунок 9).



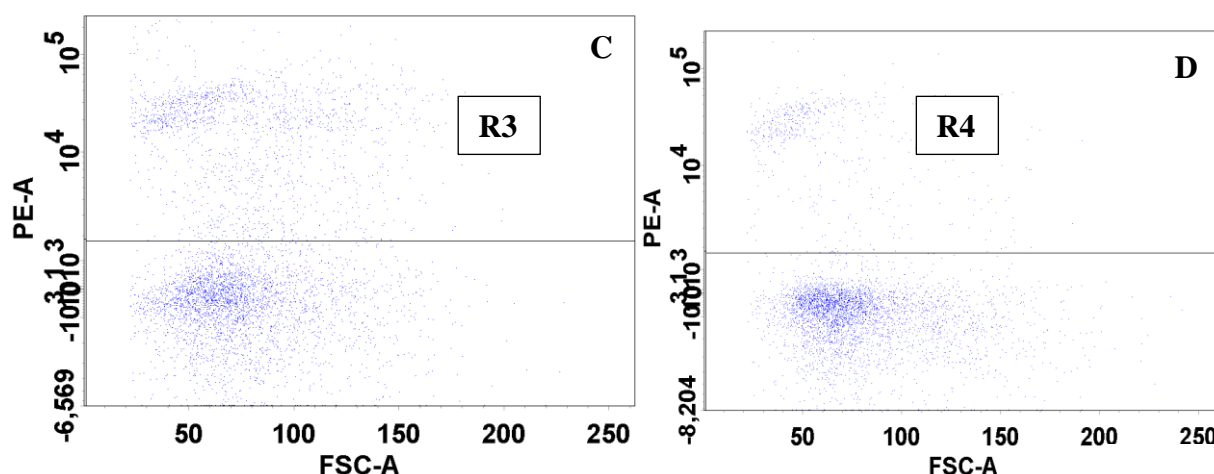


Рисунок 9. А) Двумерная гистограмма в координатах FSC-SSC суспензии клеток, полученной после совместного культивирования клеток линии JEG-3 и клеток линии NK-92. Регион R1 содержит клетки линии JEG-3. В) Двумерная гистограмма суспензии клеток в координатах FSC-FL2 (CFSE/FITC), в которую спроецировали события из региона R1. Регион R2 содержит клетки линии JEG-3. С) Двумерная гистограмма суспензии клеток в координатах FSC-FL2 (Propidium iodide /PE), в которую спроецировали события из региона R2. Регион R3 содержит мертвые клетки линии JEG-3 и отображает относительное количество погибших клеток этой линии в присутствии клеток линии NK-92. D) Двумерная гистограмма суспензии клеток в координатах FSC-FL2 (Propidium iodide /PE), в которую спроецировали события из региона R2. Регион R3 содержит мертвые клетки линии JEG-3 и отображает относительное количество погибших клеток этой линии в отсутствии клеток линии NK-92.

V. Результаты исследования.

Результаты

1. Влияние NK-клеток на относительную клеточную гибель клеток трофобласта.

В результате совместной инкубации клеток линии NK-92 и клеток линии JEG-3 относительное количество погибших клеток линии JEG-3 было выше по сравнению с их базовой гибелью. Кроме того, Цитотоксический эффект NK-клеток возрастал при увеличении соотношения киллер-мишень (Рисунок 1, приложение1, таблица 1).

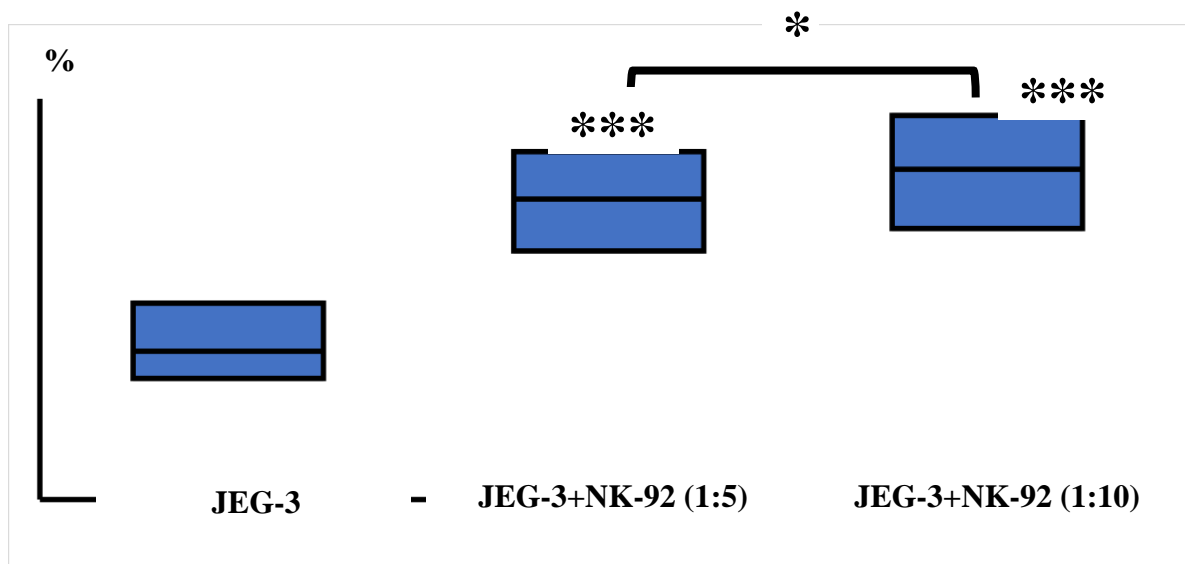


Рисунок 1. Относительная клеточная гибель клеток линии JEG-3: базовая клеточная гибель клеток линии JEG-3 (JEG-3); гибель клеток линии JEG-3 в присутствии клеток линии NK-92 в соотношении 1 к 5 (JEG-3+NK92 (1:5)); гибель клеток линии JEG-3 в присутствии клеток линии NK-92 в соотношении 1 к 10 (JEG-3+NK92 (1:10)). Отличие от базовой клеточной гибели клеток линии JEG-3 - *($p < 0.05$), **($p < 0.01$), ***($p < 0.001$).

2. Цитотоксическая активность НК-клеток в отношении клеток трофобласта в присутствии цитокинов.

Относительное количество погибших клеток линии JEG-3 было выше в присутствии следующих цитокинов: IL-1 β (100Ед/мл и 1000Ед/мл), IL-6 (1нг/мл, 2,5нг/мл, 4нг/мл), IFN γ (1000 Ед/мл), TGF β (5нг/мл, 10нг/мл), IL-4 (1нг/мл, 10нг/мл, 20нг/мл), FGF β (1нг/мл, 10нг/мл, 20 нг/мл), PLGF (20нг/мл), по сравнению с их базовой гибелью (Рисунок 2, приложение 1, таблица 1).

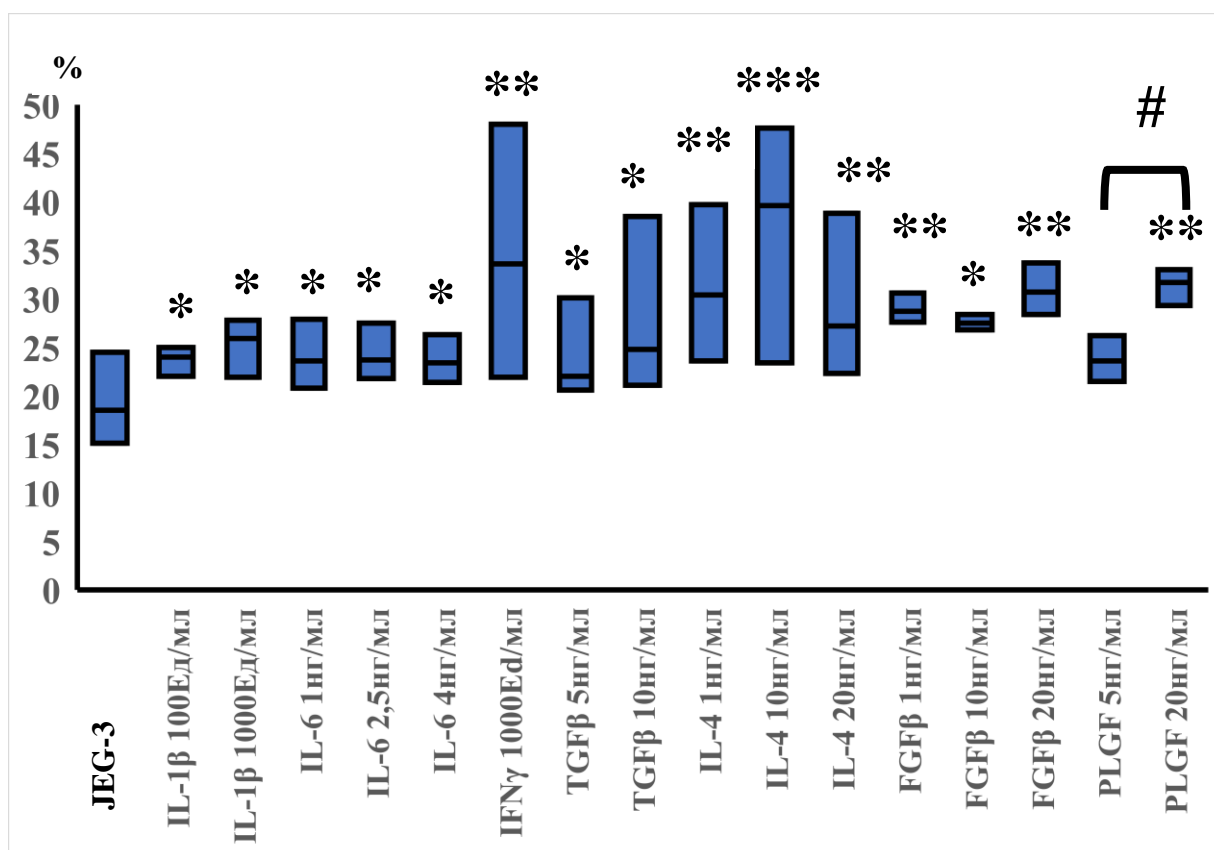
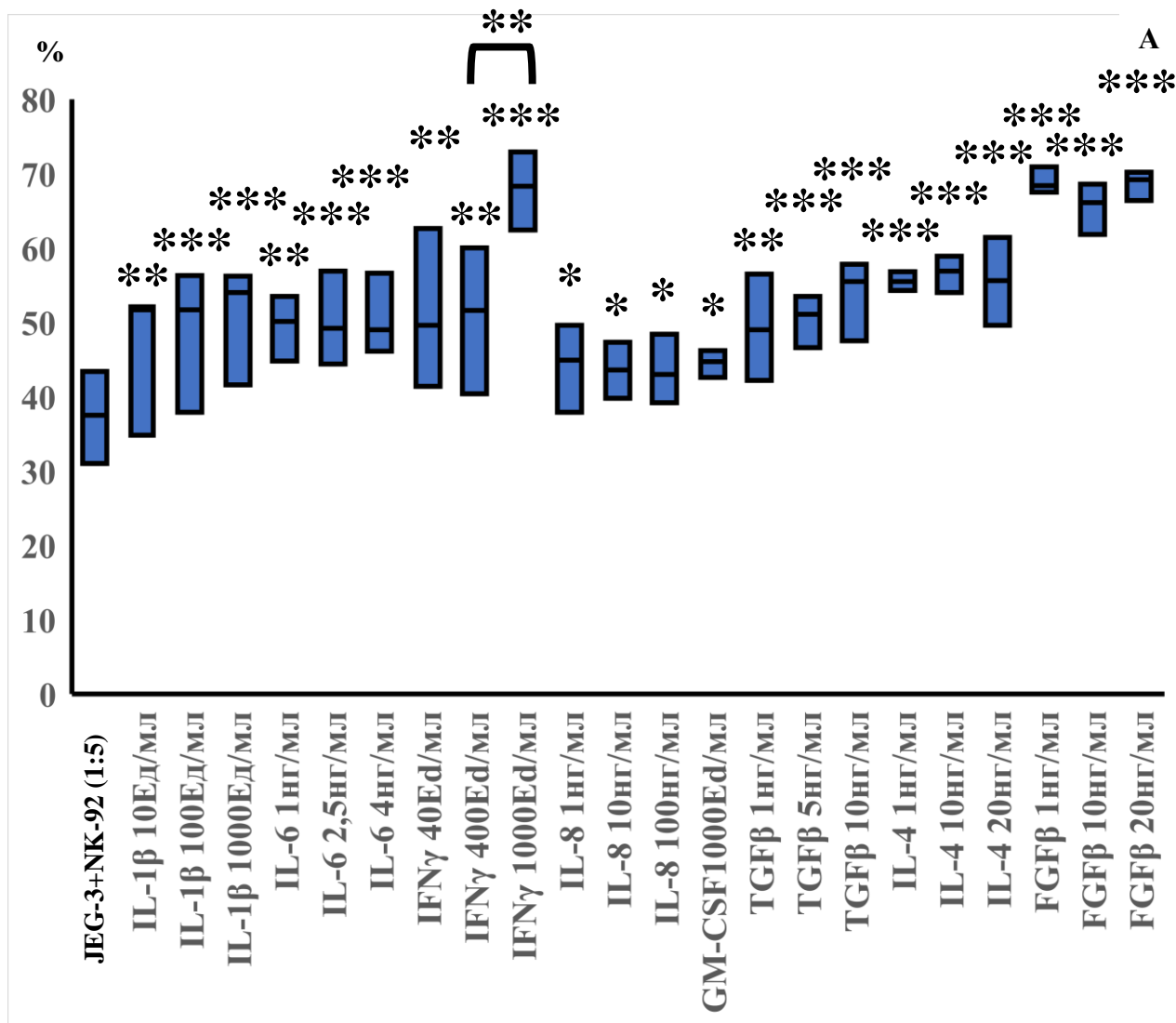


Рисунок 2. Относительное количество погибших клеток линии JEG-3 в присутствии цитокинов. Отличие от базовой клеточной гибели клеток линии JEG-3 - *($p < 0.05$), **($p < 0.01$), ***($p < 0.001$). Отличие относительного количества погибших клеток линии JEG-3 в присутствии PLGF (20нг/мл) от относительного количества погибших клеток линии JEG-3 в присутствии PLGF (5нг/мл) - #($p < 0,05$).

Цитотоксический эффект клеток линии NK-92 в отношении клеток линии JEG-3 (в соотношении киллер-мишень 5:1) был выше в присутствии следующих цитокинов: IL-1 β (10 Ед/мл, 100Ед/мл и 1000Ед/мл), IL-6 (1нг/мл, 2,5нг/мл, 4нг/мл), IFN γ (40Ед/мл, 400Ед/мл, 1000 Ед/мл), IL-8 (1нг/мл, 10нг/мл, 100нг/мл), GM-CSF (1000Ед/мл), TGF β (1нг/мл, 5нг/мл, 10нг/мл), IL-4 (1нг/мл, 10нг/мл, 20нг/мл), FGF β (1нг/мл, 10нг/мл, 20 нг/мл), по сравнению с таковым без цитокинов (Рисунок 3А, приложение 1, таблица 1). Цитотоксический эффект клеток линии NK-92 в отношении клеток линии JEG-3 (в соотношении киллер-мишень 5:1) в присутствии PLGF (1нг/мл, 5нг/мл) был ниже, по сравнению с таковым без цитокина. (Рисунок 3В, приложение 1, таблица 1).



B

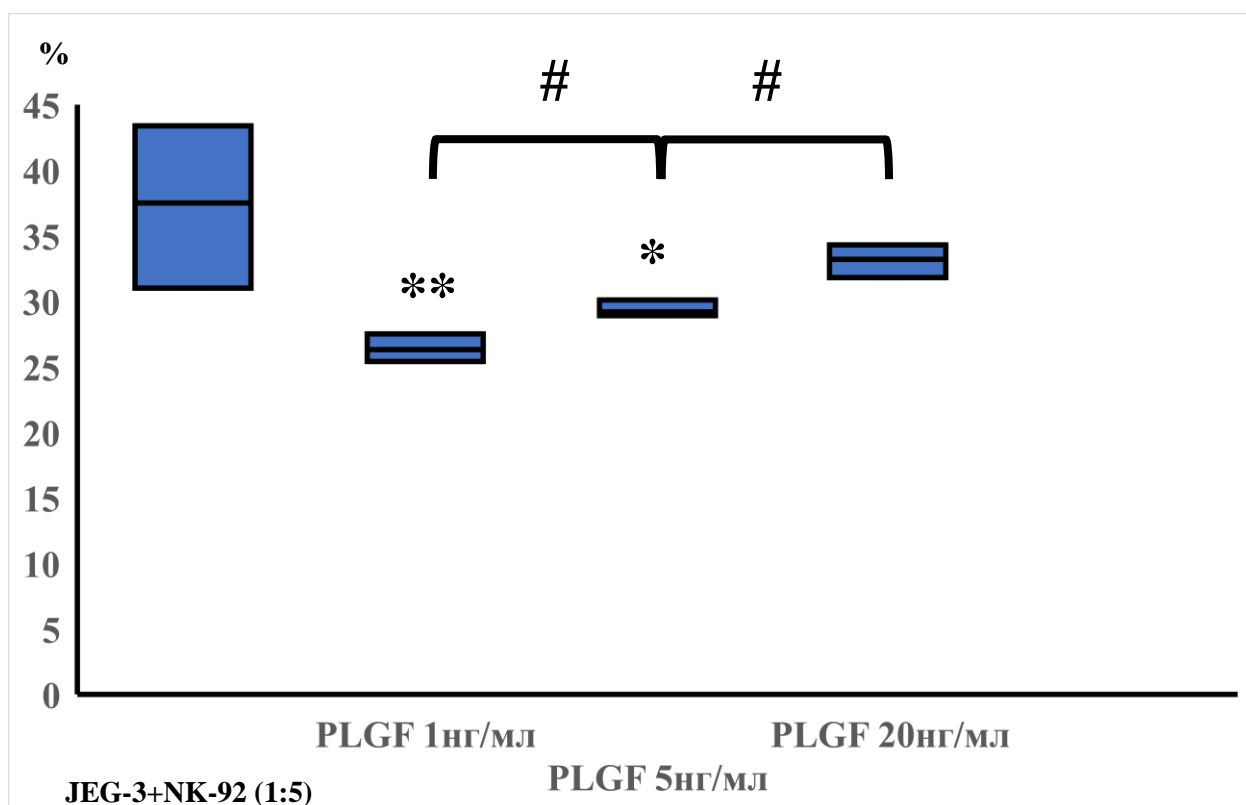


Рисунок 3А, В. Изменение цитотоксической активности клеток линии NK-92 в отношении клеток трофобласта в присутствии цитокинов. Отличие относительного количества погибших клеток линии JEG-3 в присутствии клеток линии NK-92 в отношении 1 к 5 (JEG-3+NK-92 (1:5)) от относительной клеточной гибели клеток линии JEG-3 в присутствии клеток линии NK-92 в отношении 1 к 5 и цитокина - *($p < 0.05$), **($p < 0.01$), ***($p < 0.001$).

Цитотоксический эффект клеток линии NK-92 в отношении клеток линии JEG-3 (соотношение киллер-мишень 10:1) был выше в присутствии следующих цитокинов: IL-6 (2,5нг/мл, 4нг/мл), FGFβ (1нг/мл, 10нг/мл, 20 нг/мл), по сравнению с таковым без цитокина. Цитотоксический эффект клеток линии NK-92 в отношении клеток линии JEG-3 (соотношение киллер-мишень 10:1) был ниже присутствии VEGF (1нг/мл, 10нг/мл, 100нг/мл), по сравнению с таковым без цитокина (Рисунок 4, приложение 1, таблица 1).

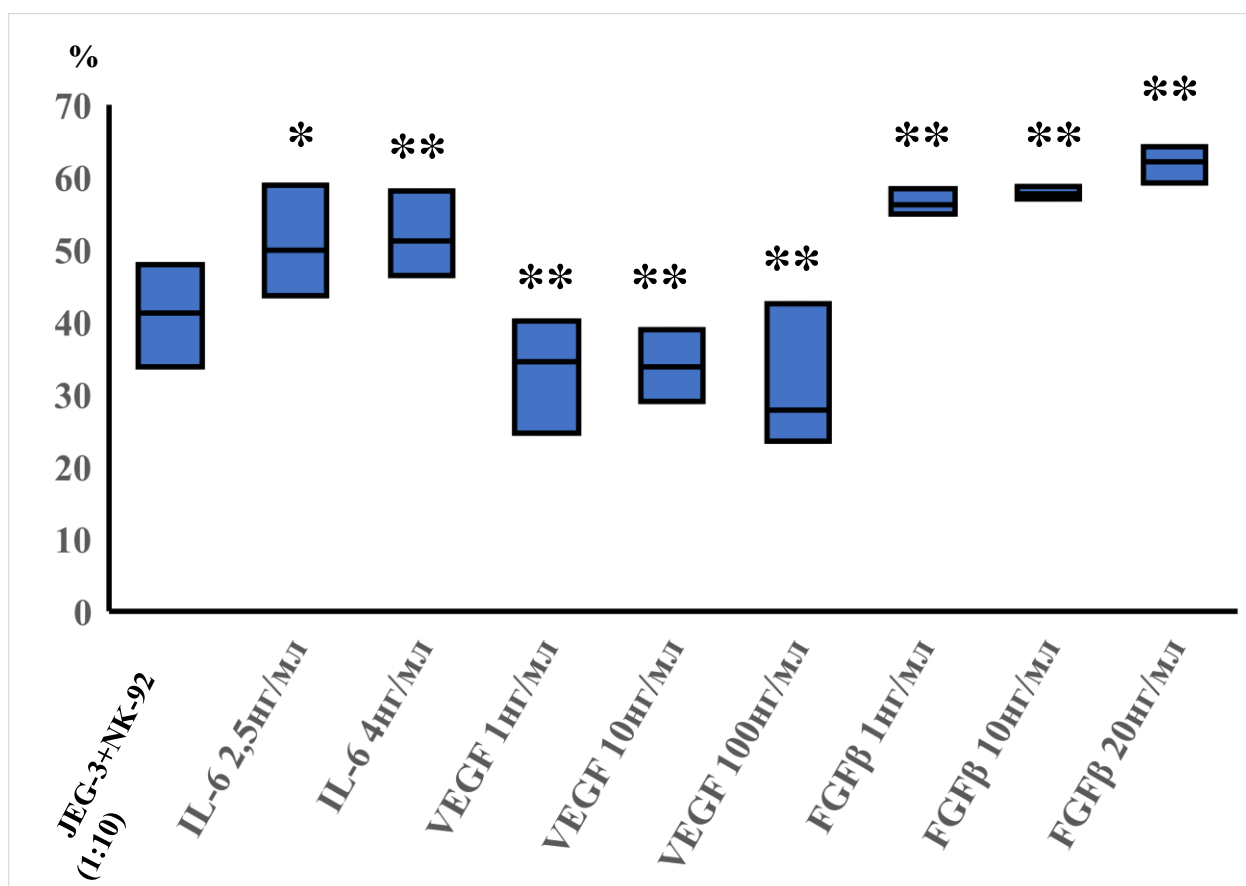


Рисунок 4. Изменение цитотоксической активности клеток линии NK-92 в отношении клеток трофобласта в присутствии цитокинов. Отличие относительного количества погибших клеток линии JEG-3 в присутствии клеток линии NK-92 в отношении 1 к 10 (JEG-3+NK-92 (1:10)) от относительной клеточной гибели клеток линии JEG-3 в присутствии клеток линии NK-92 в отношении 1 к 10 и цитокина - *($p < 0.05$), **($p < 0.01$), ***($p < 0.001$).

Сравнение относительного количества погибших клеток линии JEG-3 показало, что в присутствии следующих цитокинов: IL-1 β (10 Ед/мл, 100Ед/мл и 1000Ед/мл), IFN γ (1000 Ед/мл), IL-4 (1нг/мл, 10нг/мл, 20нг/мл), FGFB (1нг/мл), цитотоксический эффект клеток линии NK-92, взятых в соотношении 5:1, был выше, чем у клеток, взятых в соотношении 10:1 (Рисунок 5, приложение 1, таблица 1).

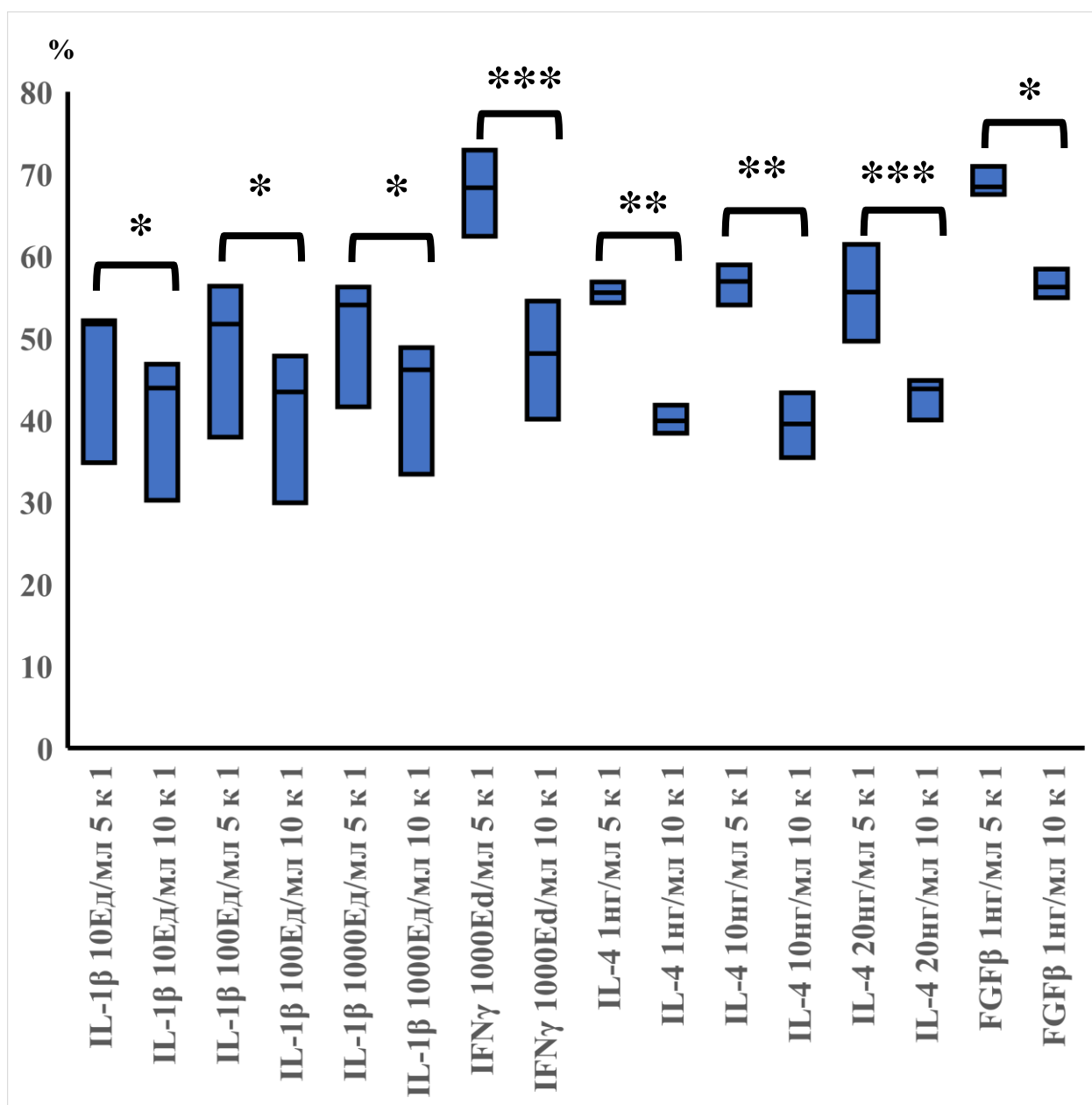


Рисунок 5. Различие цитотоксической активности клеток линии NK-92 в отношении клеток линии JEG-3 в присутствии цитокина, при их культивировании в соотношении 5 к 1 и 10 к 1. Отличие относительного количества погибших клеток линии JEG-3 в присутствии клеток линии NK-92 в отношении 1 к 5 от относительной клеточной гибели клеток линии JEG-3 в присутствии клеток линии NK-92 в отношении 1 к 10 - *($p < 0.05$), **($p < 0.01$), ***($p < 0.001$).

3. Влияние секреторных продуктов плацент на цитотоксическую активность NK-клеток в отношении клеток трофобласта.

В присутствии секреторных продуктов плацент (СПП) 1-ого и 3-его триместров цитотоксический эффект клеток линии NK-92 усиливался относительно базового уровня. Кроме того, в присутствии секреторных продуктов плацент 1-ого триместра

цитотоксическая активность клеток линии NK-92 была выше, по сравнению с таковым без секреторных продуктов (Рисунок 6, приложение 1, таблица 2).

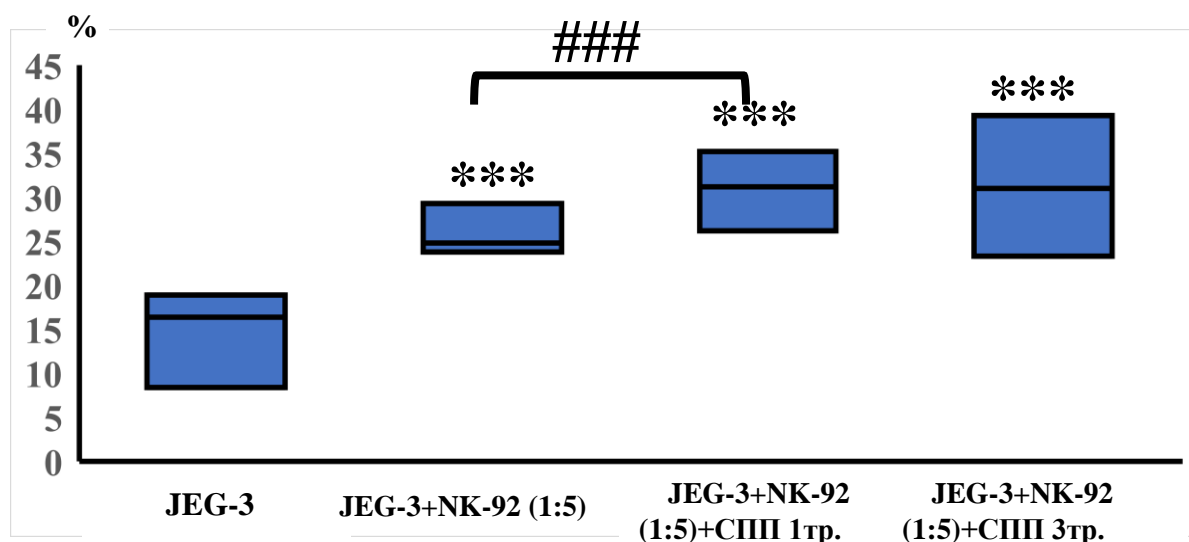


Рисунок 6. Отличие цитотоксической активности клеток линии NK-92 в отношении клеток линии JEG-3 в присутствии секреторных продуктов плацент. Отличие относительного количества погибших клеток линии JEG-3 в присутствии клеток линии NK-92 в отношении 1 к 5 (JEG-3+NK-92 (1:5), относительного количества погибших клеток линии JEG-3 в присутствии клеток линии NK-92 в отношении 1 к 5 и СПП 1-ого триместра (JEG-3+NK-92 (1:5)+СПП 1тр.), относительного количества погибших клеток линии JEG-3 в присутствии клеток линии NK-92 в отношении 1 к 5 и СПП 3-его триместра (JEG-3+NK-92 (1:5)+СПП 1тр.) от базовой относительной клеточной гибели клеток линии JEG-3 - *($p<0.05$), **($p<0.01$), ***($p<0.001$). Отличие относительного количества погибших клеток линии JEG-3 в присутствии клеток линии NK-92 в отношении 1 к 5 (JEG-3+NK-92 (1:5) от относительного количества погибших клеток линии JEG-3 в присутствии клеток линии NK-92 в отношении 1 к 5 и СПП 1-ого триместра (JEG-3+NK-92 (1:5)+СПП 1тр.) - ####($p<0,001$).

4. Изменение цитотоксической активности NK-клеток в отношении клеток трофобласта в ходе беременности.

Относительное количество погибших клеток линии JEG-3 увеличивалось при совместном культивировании с NK-клетками, выделенными из периферической крови, по сравнению с базовой гибелью. Цитотоксический эффект NK-клеток увеличивался в присутствии IL-2, по сравнению с таковым без IL-2. Цитотоксический эффект NK-клеток, выделенных из периферической крови фертильных женщин, в присутствии IL-2 был ниже, чем у контрольной группы (Рисунок 7, приложение 1, таблица 3).

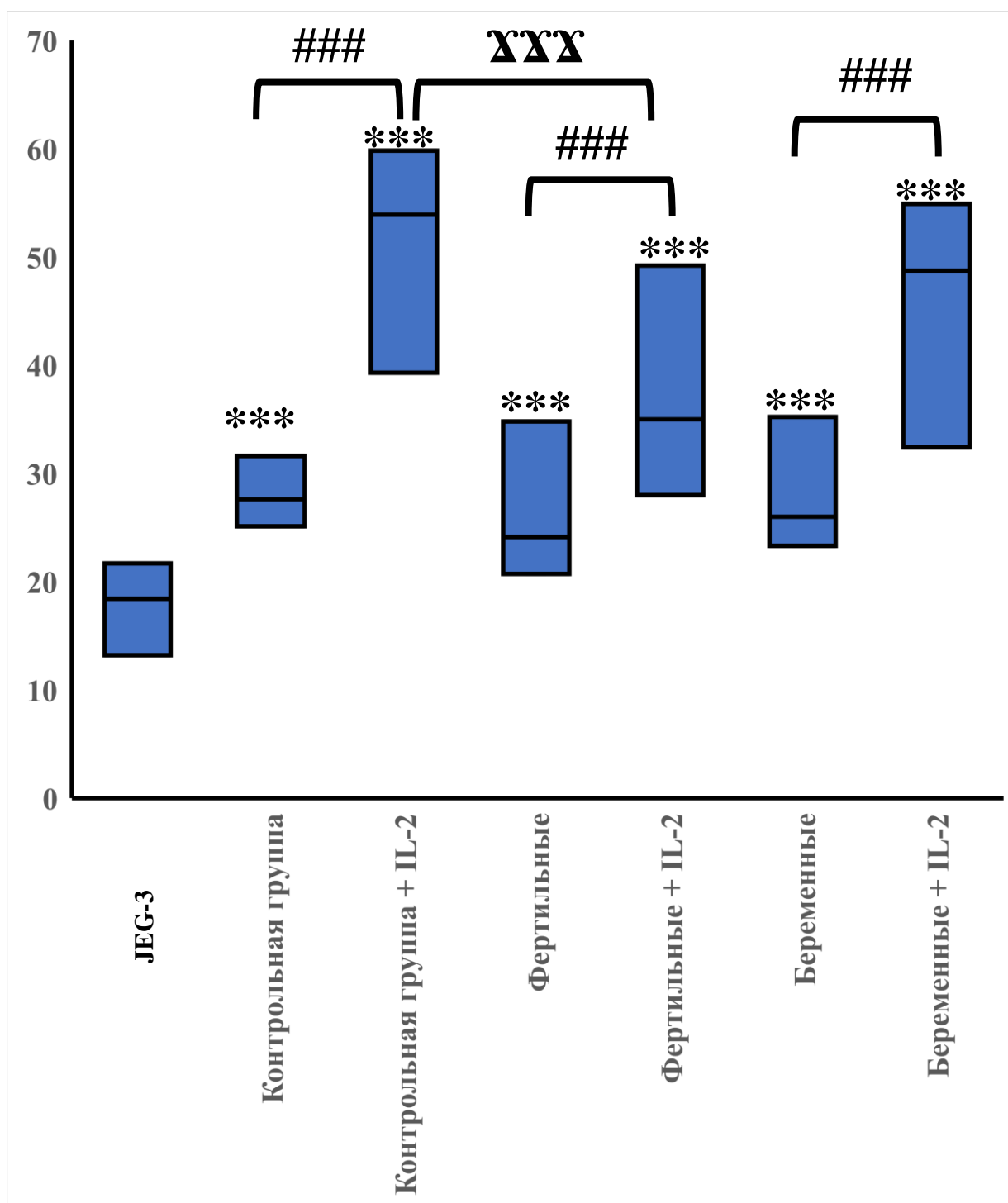


Рисунок 7. Цитотоксическая активность NK-клеток периферической крови в отношении клеток трофобласта линии JEG-3. JEG-3 – базовая относительная клеточная гибель клеток трофобласта линии JEG-3, контрольная группа - относительная клеточная гибель клеток трофобласта линии JEG-3 в присутствии NK-клеток небеременных женщин, фертильные - относительная клеточная гибель клеток трофобласта линии JEG-3 в присутствии NK-

клеток женщин с успешными родами, беременные - относительная клеточная гибель клеток трофобласта линии JEG-3 в присутствии NK-клеток беременных женщин. Отличие от базовой относительной клеточной гибели клеток линии JEG-3 - *($p < 0.05$), **($p < 0.01$), ***($p < 0.001$). Отличие цитотоксической активности NK-клеток в отношении клеток линии JEG-3 в присутствии IL-2 от цитотоксической активности NK-клеток в отсутствии одного - ###($p < 0.001$). Отличие цитотоксической активности NK-клеток небеременных женщин в отношении клеток линии JEG-3 от цитотоксической активности NK-клеток с успешными родами – XXX($p < 0.001$).

VI. Обсуждение

1. Цитотоксическая активность NK-клеток в отношении клеток трофобласта.

На первом этапе нашего исследования мы проанализировали цитотоксический потенциал клеток линии NK-92 в отношении клеток трофобласта линии JEG-3. Мы показали, что в присутствии клеток линии NK-92 клеточная гибель клеток линии JEG-3 возрастает. Более того, увеличение количества клеток линии NK-92 приводило к увеличению относительного количества погибших клеток линии JEG-3. Это говорит о том, что не смотря на ряд защитных механизмов, которыми обладают клетки трофобласта, в первую очередь экспрессия молекул HLA-C, HLA-E, HLA-G [241], NK-клетки могут реализовывать свой цитотоксический потенциал. Некоторые исследователи считают, что путем контактного взаимодействия NK-клетка может уничтожить до 4 клеток-мишеней [174]. Можно предположить, что в случае элиминации клеток трофобласта участвует не только перфорин-гранзимовый механизм, но и ряд цитокинов, продуцируемых NK-клетками.

2. Цитотоксическая активность NK-клеток в присутствии цитокинов.

Нашим следующим шагом стало исследование цитотоксической активности клеток линии NK-92 в отношении клеток трофобласта в присутствии цитокинов. В первую очередь нас интересовали цитокины, которые преобладают в зоне маточно-плацентарного контакта и те, что входят в цитокиновый репертуар NK-клеток.

IL-1 β широко представлен в зоне маточно-плацентарного контакта. За его продукцию отвечают эндометрий, цитотрофобласт, децидуальные макрофаги, плацентарные макрофаги, децидуальные CD8⁺ Т-клетки [266]. Показано, что он стимулирует инвазию и миграцию клеток трофобласта [267]. NK-клетки самостоятельно практически не

секретируют IL-1 β . Однако, в присутствии клеток мишеней, K-562, продукция данного цитокина NK-клетками возрастала [268]. Также было показано, что IL-1 β в комбинации с IL-12 усиливают продукцию IFN- γ NK-клетками [269]. Мы показали, что IL-1 β усиливает гибель клеток трофобласта, более того, в его присутствии усиливается цитотоксический эффект NK-клеток. Существуют работы, которые также показали цитотоксический эффект IL-1 β в отношении клеток трофобласта линии JAR. Блокирование рецептора к IL-1 β на клетках трофобласта снижало цитотоксический эффект цитокина. Дальнейшие исследования показали, что IL-1 β с одной стороны индуцирует апоптотическую гибель клеток линии JAR, а с другой стороны, блокирует клеточный цикл, снижает пролиферацию [270]. Таким образом, один и тот же цитокин оказывает как положительные эффекты, поддержание инвазии и миграции клеток трофобласта, так и негативные, клеточная гибель клеток трофобласта. Такой эффект подтверждает необходимость комплексного подхода к анализу межклеточных взаимодействий, т.к. даже один цитокин проявляет разные эффекты в зависимости от особенностей микроокружения.

IL-6, как и IL-1 β секретируется клетками цитотрофобласта, эндометрия, децидуальными макрофагами, плацентарными макрофагами, CD8⁺ Т-клетками. Он также стимулирует миграцию клеток трофобласта [267]. На сегодняшний день недостаточно данных, которые бы точно описывали действие IL-6 на NK-клетки или клетки трофобласта. Мы показали, что IL-6 в физиологических концентрациях индуцирует гибель клеток трофобласта. Однако, было показано, что нарушение работы IL-6 ассоциировано с эндометриозом. Так у пациенток с эндометриозом концентрация IL-6 была значительно выше. При этом снижалась цитотоксическая активность NK-клеток, у них усиливалась экспрессия ингибирующего рецептора KIR2DL3 и снижалась экспрессия TRAIL, гранзима В. Добавление антител, блокирующих IL-6, снижало эффект [271]. Таким образом один и тот же цитокин может оказывать разный эффект в зависимости от его концентрации.

IFN γ в зоне маточно-плацентарного контакта секретируют децидуальные макрофаги, dNK-клетки, децидуальные CD8⁺ Т-клетки. Показано, что этот цитокин ингибирует миграцию клеток трофобласта, активирует апоптоз и ингибирует ангиогенез [267]. В нашем исследовании IFN γ также подавлял клетки трофобласта, активируя их клеточную гибель. Схожим действием обладал TGF- β . Он также увеличивал клеточную гибель клеток трофобласта. Это соответствует данным литературы, согласно которым TGF- β активирует апоптоз трофобласта и ингибирует ангиогенез, миграцию, дифференцировку ворсин трофобласта в синцитиотрофобласт. В зоне маточно-плацентарного контакта данный цитокин продуцируют как dNK-клетки, так и сами клетки трофобласта [267].

Ряд цитокинов: IL-8, GM-CSF, IL-4 не увеличивали гибель клеток трофобласта. Однако, в их присутствии увеличивалась цитотоксическая активность NK-клеток, которая приводила к увеличению гибели клеток трофобласта. Данные литературы о влиянии IL-8 неоднозначны. Показано, что различные изоформы могут как индуцировать, так и ингибировать апоптоз. Некоторые исследователи показали, что в присутствии данного цитокина увеличивается жизнеспособность клеток трофобласта. Источниками данного цитокина являются клетки эндометрия, плацентарные и децидуальные макрофаги, клетки эндотелия. Кроме того, децидуальные NK-клетки также продуцируют IL-8 [272]. GM-CSF секретируют клетки трофобласта и децидуальные макрофаги, его также продуцируют децидуальные NK-клетки. Было показано, что этот цитокин стимулирует дифференцировку клеток трофобласта и их пролиферацию. Наши результаты также показывают, что GM-CSF не оказывает цитотоксического действия на клетки трофобласта, однако при добавлении в нашу модель NK-клеток их цитотоксическая активность усиливалась. Согласно данным литературы, GM-CSF не влияет на цитотоксичность NK-клеток [273], тем не менее, при совместном действии с IL-2, он может увеличивать эффективность киллинга NK-клетками клеток мишеней [274]. IL-4 продуцируют клетки трофобласта, плодовые эндотелиальные клетки и Т-лимфоциты. Он может стимулировать продукцию тимического стромального лимфопоэтина, который в свою очередь стимулирует пролиферацию и инвазию трофобласта. Однако, такой эффект достигается в присутствии еще одного цитокина – TNF α . Согласно литературным данным, мыши с повышенной экспрессией IL-4 характеризуются наличием особенной популяции NK-клеток (IL-NKклеток). Помимо фенотипических особенностей данная субпопуляция характеризовалась повышенной продукцией IFN γ [275]. Можно предположить, что повышенная гибель клеток трофобласта в нашей модели вызвана увеличением продуцируемого NK-клетками IFN γ в ответ на IL-4.

Некоторые ростовые факторы особенно важны во время беременности. Так PLGF и VEGF ингибируют апоптоз клеток трофобласта. VEGF контролирует все этапы ангиогенеза во время формирования плаценты, а PLGF потенцирует его действие [267]. За продукцию данных цитокинов отвечают децидуальные макрофаги, клетки трофобласта. Наши эксперименты показали, что в присутствии этих цитокинов относительная клеточная гибель клеток трофобласта не изменялась. Однако, в присутствии NK-клеток, клеточная гибель была меньше. Это говорит о том, что данные ростовые факторы влияют на NK-клетки, в результате чего те поддерживают клетки трофобласта. Показано, что в присутствии VEGF, цитотоксическая активность uNK-клеток в отношении клеток трофобласта снижается. Однако, считается, что в данном случае снижение

цитотоксичности происходит за счет воздействия VEGF на клетки трофобласта. В результате усиливается экспрессия белка TAP-1, ответственного за погрузку пептида на молекулу MHC I и дальнейшую презентацию антигена [211]. В присутствии VEGF и PLGF NK-клетки приобретают проангиогенный фенотип, у них снижается цитотоксическая активность, они становятся похожи на dNK-клетки, CD56^{superbright}CD16⁻ [276].

Хотелось бы отметить еще одну особенность. В наших экспериментах, цитокины: IL-1 β , IFN γ , TGF β , IL-8, GM-CSF, IL-4, увеличивали цитотоксичность NK-клеток, взятых в соотношении 5:1, но не 10:1. NK22 – субпопуляция NK-клеток, главная характеристика, которых – продукция IL-22. Эти клетки характерны для тканей эндометрия, но встречаются и в периферической крови. Также было показано, что с увеличением относительного количества этих клеток среди клеток периферической крови уменьшается количество NK-клеток, продуцирующих IFN γ и TNF α [277]. Можно предположить, что в популяции NK-клеток присутствует своеобразная система сдержек и противовесов: в ответ на увеличение концентрации провоспалительного цитокина ряд клеток начинает продуцировать IL22, меняется секреторный репертуар. Поэтому большему количеству клеток требуется большая концентрация цитокина для аналогичного эффекта. Такой механизм может быть крайне важен при беременности, так как может предотвратить цепную реакцию, приводящую к воспалению.

Неоднозначным остается действие цитокина FGF β . Большинство исследований показывают, что данный цитокин ингибирует апоптоз, стимулирует дифференцировку и пролиферацию [267]. Однако, в наших экспериментах данный цитокин усиливал относительную клеточную гибель клеток трофобласта.

На основе наших экспериментов мы сделали следующие выводы:

- NK-клетки оказывают цитотоксический эффект на клетки трофобласта, увеличивая относительную клеточную гибель.
- Цитокины: IL1 β , IL-6, IFN γ , TGF β , FGF β увеличивают относительную клеточную гибель клеток трофобласта.
- Цитокины: IL1 β , IL-6, IFN γ , TGF β , FGF β , IL-8, GM-CSF, IL-4, увеличивают цитотоксическую активность NK-клеток в отношении клеток трофобласта.
- NK-клетки в присутствии ростовых факторов: VEGF, PLGF, уменьшали относительную клеточную гибель клеток трофобласта.
- Действие цитокина может зависеть от количества NK-клеток.

Таким образом, NK-клетки не только оказывают цитотоксическую активность на клетки трофобласта, но и ряд цитокинов, характерных для зоны маточно-плацентарного контакта усиливают их действие. Однако, действие некоторых цитокинов в нашей модели не соответствовало ряду данных литературы, что можно объяснить как важностью клеточного микроокружения, так и эффектами, которые достигаются в присутствии нескольких цитокинов, а не отдельно взятых. Поэтому на следующем этапе мы решили изучить влияние на цитотоксическую активность секреторных продуктов плацент, содержащих «коктейль» цитокинов.

3. Влияние секреторных продуктов плацент на цитотоксическую активность NK-клеток.

Наши эксперименты показали, что в присутствии секреторных продуктов плацент 1-ого триместра цитотоксическая активность NK-клеток в отношении клеток трофобласта увеличивалась. На сегодняшний день показано, что на разных этапах беременности плацента секретирует цитокины в разных концентрациях. Например, к 3-ему триместру беременности отмечено повышение секреции IL-10 и IL-4, что связывают с усилением их антиапоптотической роли в отношении клеток плаценты. Это также способствует ингибции активности цитотоксических лимфоцитов матери. Также повышается секреция IFN γ и TNF α , что обеспечивает стабилизацию пролиферативных процессов в ткани плаценты [265]. Одни из первых работ по оценке цитотоксической активности NK-клеток в ходе беременности показали, что пик цитотоксической активности NK-клеток приходится на первый триместр, а именно 7-8 неделю и снижается к третьему триместру [278]. В это время происходит один из ключевых этапов беременности – инвазия трофобласта. Данный процесс должен проходить под строгим контролем, так как трофобласт не должен добраться до эндометрия. Поэтому этот этап регулируется путем селективного клеточного апоптоза. Такой эффект может достигаться за счет дифференциальной секреции клетками трофобласта ростовых факторов: VEGF и PLGF. Эти цитокины, как было показано и в наших исследованиях выполняют протективную функцию для клеток трофобласта. На ранних стадиях клетки цитотрофобласта, формирующие колонны и заякоривающие ворсины, секретируют, как VEGF, так и PLGF. Однако, позже уровни этих цитокинов снижаются [279]. В пользу того, что NK-клетки проявляют цитотоксическую активность во время беременности говорит и то, что они секретируют цитокины, индуцирующие апоптоз клеток трофобласта [15].

Долгое время считалось, что цитотоксическая активность NK-клеток в отношении клеток трофобласта носит исключительно негативный оттенок. Вскоре тестирование NK-

клеток стало обязательным при беременности, сначала их количество, а затем их цитотоксичность. Существует несколько общепринятых методов для определения активности NK-клеток. Самый распространенный – оценка цитотоксичности NK-клеток с помощью клеток мишеней. В качестве мишеней выступают клетки линии K-562 [2]. Стоит отметить, что такой подход исключает все особенности микроокружения в зоне маточно-плацентарного контакта, кроме того, нивелируются главные мишени NK-клеток при беременности – клетки трофобласта.

Наша клеточная модель более приближена к модели *in vivo*, так как учитывает особенности клеток трофобласта. Нам также удалось показать, что NK-клетки реализуют свой цитотоксический потенциал в отношении клеток трофобласта. На основании наших данных также можно сделать вывод о том, что в зоне маточно-плацентарного контакта находятся цитокины, позволяющие как увеличивать цитотоксическую активность NK-клеток, так и уменьшать ее, что может быть крайне важным на разных этапах развития беременности. Например, в первом триместре беременности, когда для сдерживания инвазивного трофобласта требуется активное его элиминирование NK-клетками, что также удалось показать на нашей *in vitro* модели. Мы надеемся, что дальнейшее усовершенствование нашей клеточной модели позволит создать удобный лабораторный метод для оценки цитотоксической активности NK-клеток во время беременности, а дальнейшие исследования позволят правильно интерпретировать полученные результаты.

Разумеется, остается еще много переменных. Одной из них является уникальность субпопуляционного состава клеток в зоне маточно-плацентарного контакта. Важно помнить, что недостаточно применять для исследований просто NK-клетки, так как при беременности на разных ее этапах ведущую роль могут играть uNK-клетки, эндометриальные NK-клетки, дNK-клетки. Однако, забор этих клеточных субпопуляций крайне инвазивен для лабораторной диагностики. Поэтому мы решили оценить цитотоксическую активность NK-клеток периферической крови в отношении клеток трофобласта и посмотреть, как на нее влияет беременность.

4. Изменение цитотоксической активности NK-клеток периферической крови в отношении клеток трофобласта во время беременности.

Нами установлено, что pNK-клетки небеременных, фертильных и беременных женщин увеличивают цитотоксическую клеточную гибель клеток трофобласта. Их цитотоксический эффект увеличивался в присутствии IL-2. Более того, женщины,

прошедшие через беременность, с последующими успешными родами, показали пониженную цитотоксическую активность по сравнению с небеременными женщинами.

На основании этих результатов можно предположить, что изменения, которые происходят в организме женщины во время беременности, затрагивают НК-клетки. В результате чего у последних снижается цитотоксическая активность в отношении клеток трофобласта. Мало вероятно, что в результате беременности у НК-клеток снизился цитотоксический потенциал. Подобный эффект ослабил бы иммунную систему матери, а последние исследования показывают, что снижение цитотоксической активности НК-клеток ассоциировано с эндометриозом и осложнением беременности [280]. Поэтому мы предполагаем, что в данном случае уменьшение цитотоксической активности НК-клеток направлено именно против клеток трофобласта. Однако, для подобного эффекта должен выполняться ряд условий:

- Во-первых, НК-клетки должны распознавать клетки трофобласта с высокой долей специфичности.
- Во-вторых, в исследовании приняли участие женщины, у которых с момента родов прошло более 3 лет, а НК-клетки – короткоживущие клетки (время полужизни составляет 7-10 суток) [107], следовательно с момента беременности должны были смениться и обновиться несколько поколений НК-клеток. В этом случае, одним из возможных вариантов может быть формирование пула НК-клеток, который поддерживался все это время.

В последнее время все больше исследований дают результаты, на основании которых можно предположить наличие у НК-клеток подобия клеточной памяти [281]. Было показано, что НК-клетки вступают в реакцию гиперчувствительности в ответ на модифицированные гаптены [282, 283], на макаках резус было показано, что НК-клетки активней убивают клетки, зараженные SHIV (simian-human immunodeficiency virus, вирус иммунодефицита обезьян), если до этого у них был контакт с данным вирусом [284]. Мы считаем, что одним из способов, в результате которого образуются долгоживущие НК-клетки с пониженной цитотоксической активностью к клеткам трофобласта, может быть механизм сходный с формированием НК-клеток памяти.

Было показано, что в результате беременности образуется пул CD8⁺ Т-клеток, специфичных к клеткам плода и демонстрирующих фенотип клеток памяти [285]. Сегодня гораздо подробнее описаны фенотипические особенности Т-клеток памяти и все те изменения, которые в них происходят (изменение метаболических путей, изменения в

экспрессии ряда генов: Eomes, T-bet). Некоторые из этих изменений характерны и для NK-клеток памяти. Мы уверены, что дальнейшее изучение влияния беременности на NK-клетки позволит дать однозначный ответ, образуются ли во время беременности NK-клетки памяти. Тогда мы получим уникальную модель для исследования формирования иммунологической памяти в клетках врожденного иммунитета, что крайне важно для понимания не только репродуктивной иммунологии, но и фундаментальной иммунологии в целом.

VII. Выводы

1. НК-клетки линии NK-92 обладали цитотоксическим потенциалом в отношении клеток трофобласта линии JEG-3. Увеличение соотношения киллер-мишень усиливало относительную гибель клеток линии JEG-3.
2. Цитокины: IL-1 β , IL-6, IFN γ , TGF β , IL-4, FGF β , PLGF усиливали относительную гибель клеток трофобласта линии JEG-3
3. Цитотоксическая активность клеток линии NK-92 в отношении клеток трофобласта линии JEG-3, взятых в соотношении 5:1 усиливалась в присутствии цитокинов: IL-1 β , IL-6, IFN γ , IL-8, GM-CSF, TGF β , IL-4, FGF β и уменьшалась в присутствии PLGF.
4. Цитотоксическая активность клеток линии NK-92 в отношении клеток трофобласта линии JEG-3, взятых в соотношении 10:1 усиливалась в присутствии цитокинов: IL-6, FGF β и уменьшалась в присутствии VEGF.
5. В присутствии цитокинов: IL-1 β , IFN γ , IL-4, FGF β цитотоксический потенциал НК-клеток линии NK92 в отношении клеток трофобласта линии JEG-3, взятых в соотношении 5:1, был выше, чем у НК-клеток, взятых в соотношении 10:1.
6. Цитотоксическая активность клеток линии NK-92 в отношении клеток трофобласта линии JEG-3 была выше в присутствии секреторных продуктов плацент первого триместра.
7. НК-клетки периферической крови обладали цитотоксическим потенциалом в отношении клеток трофобласта линии JEG-3. Этот эффект усиливался в присутствии IL-2.
8. Женщины после успешных родов отличались от небеременных женщин пониженной цитотоксической активностью НК-клеток периферической крови в отношении клеток трофобласта линии JEG-3.

VIII. Приложения.

Таблица 1. Цитотоксическая активность клеток линии NK-92 в отношении клеток трофобласта линии JEG.

| Индуктор | Соотношение клеток линии NK-92 к клеткам линии JEG-3. | | |
|---|--|-----------------------------------|-------------------------|
| | 0:1 | 5:1 | 10:1 |
| Полная культуральная среда DMEM без добавления цитокинов (базовая смертность) | 18,5 [15,1;24,5] | 37,5 [31,0;43,4] *** | 41,2 [33,8;47,9] |
| IL-1 β 10Ед/мл | 22,7 [20,3;24,2] | 51,7 [34,8;52,1] *** \$\$ | 43,9 [30,2;46,8] *** |
| IL-1 β 100Ед/мл | 24,0 [22,0;25,0] * | 51,7 [37,9;56,3] *** \$\$\$ | 43,4 [29,9;47,8] *** |
| IL-1 β 1000Ед/мл | 25,9 [21,9;27,8] * | 54,0 [41,6;56,2] *** \$\$\$ | 46,1 [33,4;48,8] *** |
| IL-6 1нг/мл | 23,6 [20,8;27,9] * | 50,1 [44,8;53,5] *** \$\$ | 50,6 [39,8;59,8] *** |
| IL-6 2,5нг/мл | 23,7 [21,8;27,5] * | 49,2 [44,4;56,9] *** \$\$\$ | 49,9 [43,6;58,9] *** |
| IL-6 4нг/мл | 23,4 [21,4;26,3] * | 49,0 [46,1;56,6] *** \$\$\$ | 51,2 [46,4;58,1] *** |
| IFN γ 40Ед/мл | 20,8 [19,4;21,2] | 49,6 [41,4;62,6] *** \$\$ | 33,1 [31,2;55,9] *** |
| IFN γ 400Ед/мл | 21,6 [20,7;23,4] | 51,6 [40,4;60,0] *** \$\$ | 43,7 [33,6;55,4] *** |

| | | | |
|------------------------|------------------------|--------------------------------|-------------------------|
| | | | |
| IFN γ 1000Ed/мл | 33,6 [21,9;48,0] ** | 68,3 [62,4;72,9] *** \$\$\$ | 48,1 [40,1;54,5] *** |
| TNF α 10Ed/мл | 22,1 [21,5;23,2] | 44,8 [35,4;45,7] *** | 40,4 [40,1;42,2] *** |
| TNF α 50Ed/мл | 21,5 [20,6;23,3] | 39,1 [34,0;47,0] *** | 39,1 [37,9;39,5] *** |
| TNF α 400Ed/мл | 21,1 [20,8;27,3] | 38,6 [33,4;44,3] *** | 40,8 [39,6;42,5] *** |

| | | | |
|---------------------|-----------------------|--------------------------------|-------------------------|
| IL-8 1нг/мл | 20,2 [19,7;20,8] | 44,9 [37,9;49,6] *** \$ | 44,5 [42,9;45,7] *** |
| IL-8 10нг/мл | 20,8 [19,0;21,7] | 43,6 [39,8;47,3] *** \$ | 44,1 [41,8;44,4] *** |
| IL-8 100нг/мл | 22,4 [18,4;24,1] | 43,0 [39,2;48,4] *** \$ | 44,8 [41,0;48,2] *** |
| GM-CSF 10Ed/мл | 23,1 [22,1;23,7] | 40,5 [37,5;45,6] *** | 40,6 [36,0;44,0] *** |
| GM-CSF 100Ed/мл | 22,9 [21,0;23,5] | 41,8 [41,4;42,2] *** | 41,0 [39,0;43,4] *** |
| GM-CSF1000Ed/мл | 24,0 [21,1;25,4] | 44,7 [42,6;46,2] *** \$ | 43,0 [38,8;48,3] *** |
| TGF β 1нг/мл | 25,4 [15,3;34,9] | 49,0 [42,2;56,5] *** \$\$ | 44,8 [36,3;49,7] *** |
| TGF β 5нг/мл | 22,0 [20,6;30,1] * | 51,1 [46,6;53,5] *** \$\$\$ | 48,5 [36,1;51,0] *** |
| TGF β 10нг/мл | 24,8 [21,1;38,5] * | 55,5 [47,5;57,8] *** \$\$\$ | 36,0 [32,9;54,8] *** |
| VEGF 1нг/мл | 21,8 [18,8;22,5] | 38,3 [31,4;45,3] *** | 34,5 [24,6;40,1] *** |
| VEGF 10нг/мл | 20,8 [20,4;22,0] | 39,3 [32,7;47,0] *** | 33,8 [29,0;38,9] *** |
| VEGF 100нг/мл | 21,0 [20,8;21,1] | 39,3 [34,0;44,3] *** | 27,8 [23,5;42,5] *** |

| | | | |
|----------------|-------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| IL-4 1нг/мл | 30,4 [23,6;39,7] ** | 55,5 [54,3;56,8] *** \$\$\$ | 39,9 [38,4;41,8] *** |
| IL-4 10нг/мл | 39,6 [23,4;47,6] *** | 56,9 [54,0;58,9] *** \$\$\$ | 39,5 [35,4;43,3] *** |
| IL-4 20нг/мл | 27,2 [22,3;38,8] ** | 55,6 [49,6;61,4] *** \$\$\$ | 43,8 [40,0;44,8] *** |
| FGFβ 1нг/мл | 28,7 [27,6;30,6] ** | 68,4 [67,5;70,9] *** \$\$\$ | 56,2 [54,9;58,4] *** \$\$ |
| FGFβ 10нг/мл | 27,5 [26,8;28,4] * | 66,1 [61,8;68,6] *** \$\$\$ | 57,7 [57,0;58,7] *** \$\$ |
| FGFβ 20нг/мл | 30,7 [28,4;33,7] ** | 69,2 [66,4;70,2] *** \$\$\$ | 62,1 [59,2;64,2] *** \$\$ |
| PLGF 1нг/мл | 23,6 [21,8;24,5] | 26,3 [25,4;27,5] \$\$ * | 34,9 [29,9;38,2] ** |
| PLGF 5нг/мл | 23,6 [21,5;26,2] ** | 29,2 [28,9;30,1] ** \$ | 33,4 [31,0;35,8] ** |
| PLGF 20нг/мл | 31,7 [29,3;33,0] | 33,2 [31,8;34,3] ** | 37,1 [34,7;39,3] ** |
| IL-10 50Ed/мл | 23,3 [20,3;25,4] | 31,3 [28,5;34,4] ** | 32,7 [31,0;33,6] ** |
| IL-10 100Ed/мл | 22,6 [20,6;24,5] | 32,2 [29,8;34,0] ** | 32,8 [30,0;33,8] ** |
| IL-10 200Ed/мл | 22,3 [21,0;23,5] | 33,4 [32,0;34,0] ** | 31,9 [31,5;33,0] ** |

* – отличие от базовой относительной клеточной гибели клеток линии JEG-3; \$ – отличие цитотоксической активности клеток линии NK-92 в отношении клеток линии JEG-3 в присутствии цитокина от таковой без цитокина.

Таблица 2. Цитотоксическая активность клеток линии NK-92 в отношении клеток трофобласта линии JEG в присутствии секреторных продуктов плацент 1-ого и 3-его триместров.

| | |
|----------------|-----------------|
| Группа доноров | |
| Базовая гибель | 16,4 [8,4;18,9] |

| | |
|-----------------------------------|-------------------------|
| NK-92+JEG-3 + СПП (1-ый триместр) | 31,2 [26,2;35,2]*** ### |
| NK-92+JEG-3 + СПП (3-ий триместр) | 31,0 [23,3;39,3]*** |
| NK-92+JEG-3 | 24,8 [23,8;29,3]*** |

***- $p < 0.001$, отличие от базовой относительной клеточной гибели клеток линии JEG-3; ###- $p < 0.001$, отличие от относительной клеточной гибели клеток линии JEG-3 в присутствии клеток линии NK-92 (NK-92+JEG-3).

Таблица 3. Цитотоксическая активность NK-клеток периферической крови в отношении клеток трофобласта линии JEG-3.

| Группа доноров | Индуктор | |
|--|------------------------|--------------------------------|
| | В отсутствии индуктора | В присутствии IL-2 |
| Полная культуральная среда DMEM (базовая смертность) | | 18,4 [13,2;21,7] |
| Контрольная группа | 27,6 [25,1;31,6]*** | 53,9 [39,3;59,8]*** ### |
| Фертильные | 24,1 [20,7;34,8]*** | 35,0 [28,0;49,2]*** ### &&& |
| Беременные | 26,0 [23,3;35,2]*** | 48,7 [32,4;54,9]*** ### |

***- $p < 0.001$, отличие от базовой относительной клеточной гибели клеток линии JEG-3; ###- $p < 0.001$, отличие цитотоксической активности NK-клеток в присутствии IL-2 от таковой без него; &&&- $p < 0.001$, отличие цитотоксической активности NK-клеток фертильных женщин от контрольной группы.

IX. Список литературы.

1. А.о, А., О.Н. Беспалова, Д.И. Соколов, С.А. Сельков, И.Ю. Коган, *Роль естественных киллеров (NK-клеток) в репродуктивных потерях*. Журнал акушерства и женских болезней, 2017. **66**: p. 143-156.
2. Moffett, A. and N. Shreeve, *First do no harm: uterine natural killer (NK) cells in assisted reproduction*. Human Reproduction, 2015. **30**(7): p. 1519-1525.
3. Gaynor, L.M. and F. Colucci, *Uterine Natural Killer Cells: Functional Distinctions and Influence on Pregnancy in Humans and Mice*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 467.
4. С, Г., *Биология развития* 2014: Sinauer Associates, Inc.
5. Колобов А.В., Ц.В.А., *Плацента человека морфофункциональные основы*. 2011.
6. Должиков А.А., З.С.В., *Прикладная морфология для студентов и врачей. Морфология последа человека*. .
7. Medawar, P.B., *Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates*. Symp Soc Exp Biol, 1953. **1953**(7): p. 320-38.
8. Erlebacher, A., *Immunology of the maternal-fetal interface*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 387-411.
9. Robertson, S.A., M. Brannstrom, and R.F. Seamark, *Cytokines in rodent reproduction and the cytokine-endocrine interaction*. Curr Opin Immunol, 1992. **4**(5): p. 585-90.
10. Fox, H.S., B.L. Bond, and T.G. Parslow, *Estrogen regulates the IFN-gamma promoter*. J Immunol, 1991. **146**(12): p. 4362-7.
11. Fung, K.Y., et al., *Interferon-epsilon protects the female reproductive tract from viral and bacterial infection*. Science, 2013. **339**(6123): p. 1088-92.
12. Miller, L., et al., *Progesterone inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide production in murine macrophages*. J Leukoc Biol, 1996. **59**(3): p. 442-50.
13. Hunt, J.S. and J.W. Pollard, *Macrophages in the uterus and placenta*. Curr Top Microbiol Immunol, 1992. **181**: p. 39-63.
14. Trundley, A. and A. Moffett, *Human uterine leukocytes and pregnancy*. Tissue Antigens, 2004. **63**(1): p. 1-12.
15. Moffett-King, A., *Natural killer cells and pregnancy*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(9): p. 656-63.
16. Mao, G., et al., *Progesterone increases systemic and local uterine proportions of CD4+CD25+ Treg cells during midterm pregnancy in mice*. Endocrinology, 2010. **151**(11): p. 5477-88.
17. Arcuri, F., et al., *Macrophage migration inhibitory factor in the human endometrium: expression and localization during the menstrual cycle and early pregnancy*. Biol Reprod, 2001. **64**(4): p. 1200-5.
18. Caballero-Campo, P., et al., *Hormonal and embryonic regulation of chemokines IL-8, MCP-1 and RANTES in the human endometrium during the window of implantation*. Mol Hum Reprod, 2002. **8**(4): p. 375-84.
19. Sentman, C.L., et al., *Recruitment of uterine NK cells: induction of CXC chemokine ligands 10 and 11 in human endometrium by estradiol and progesterone*. J Immunol, 2004. **173**(11): p. 6760-6.
20. Daikoku, N., et al., *Expression of macrophage inflammatory protein-3beta in human endometrium throughout the menstrual cycle*. Fertil Steril, 2004. **81 Suppl 1**: p. 876-81.
21. Care, A.S., et al., *Macrophages regulate corpus luteum development during embryo implantation in mice*. J Clin Invest, 2013. **123**(8): p. 3472-87.
22. Samy, E.T., et al., *The role of physiological self-antigen in the acquisition and maintenance of regulatory T-cell function*. Immunol Rev, 2006. **212**: p. 170-84.
23. Hunt, J.S., et al., *Immunogenicity of the soluble isoforms of HLA-G*. Mol Hum Reprod, 2003. **9**(11): p. 729-35.
24. Jurisicova, A., et al., *HLA-G expression during preimplantation human embryo development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(1): p. 161-5.

25. Hutter, H. and G. Dohr, *HLA expression on immature and mature human germ cells*. J Reprod Immunol, 1998. **38**(2): p. 101-22.
26. Selmani, Z., et al., *Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells*. Stem Cells, 2008. **26**(1): p. 212-22.
27. Tremellen, K.P., R.F. Seaman, and S.A. Robertson, *Seminal transforming growth factor beta1 stimulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production and inflammatory cell recruitment in the murine uterus*. Biol Reprod, 1998. **58**(5): p. 1217-25.
28. Sharkey, D.J., et al., *TGF-beta mediates proinflammatory seminal fluid signaling in human cervical epithelial cells*. J Immunol, 2012. **189**(2): p. 1024-35.
29. Denison, F.C., A.A. Calder, and R.W. Kelly, *The action of prostaglandin E2 on the human cervix: stimulation of interleukin 8 and inhibition of secretory leukocyte protease inhibitor*. Am J Obstet Gynecol, 1999. **180**(3 Pt 1): p. 614-20.
30. Sharkey, D.J., et al., *Seminal fluid induces leukocyte recruitment and cytokine and chemokine mRNA expression in the human cervix after coitus*. J Immunol, 2012. **188**(5): p. 2445-54.
31. De, M., R. Choudhuri, and G.W. Wood, *Determination of the number and distribution of macrophages, lymphocytes, and granulocytes in the mouse uterus from mating through implantation*. J Leukoc Biol, 1991. **50**(3): p. 252-62.
32. Guerin, L.R., et al., *Seminal fluid regulates accumulation of FOXP3+ regulatory T cells in the preimplantation mouse uterus through expanding the FOXP3+ cell pool and CCL19-mediated recruitment*. Biol Reprod, 2011. **85**(2): p. 397-408.
33. Robertson, S.A., *GM-CSF regulation of embryo development and pregnancy*. Cytokine Growth Factor Rev, 2007. **18**(3-4): p. 287-98.
34. Zhang, Y.M., V. Rao Ch, and Z.M. Lei, *Macrophages in human reproductive tissues contain luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors*. Am J Reprod Immunol, 2003. **49**(2): p. 93-100.
35. van Mourik, M.S., N.S. Macklon, and C.J. Heijnen, *Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment*. J Leukoc Biol, 2009. **85**(1): p. 4-19.
36. Mjosberg, J., et al., *FOXP3+ regulatory T cells and T helper 1, T helper 2, and T helper 17 cells in human early pregnancy decidua*. Biol Reprod, 2010. **82**(4): p. 698-705.
37. Bulmer, J.N., L. Morrison, and J.C. Smith, *Expression of class II MHC gene products by macrophages in human uteroplacental tissue*. Immunology, 1988. **63**(4): p. 707-14.
38. Hunt, J.S., et al., *HLA-G and immune tolerance in pregnancy*. FASEB J, 2005. **19**(7): p. 681-93.
39. Huang, Y., et al., *Human trophoblasts recruited T lymphocytes and monocytes into decidua by secretion of chemokine CXCL16 and interaction with CXCR6 in the first-trimester pregnancy*. J Immunol, 2008. **180**(4): p. 2367-75.
40. Sica, A. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas*. J Clin Invest, 2012. **122**(3): p. 787-95.
41. Svensson, J., et al., *Macrophages at the fetal-maternal interface express markers of alternative activation and are induced by M-CSF and IL-10*. J Immunol, 2011. **187**(7): p. 3671-82.
42. Schmidt, T. and P. Carmeliet, *Blood-vessel formation: Bridges that guide and unite*. Nature, 2010. **465**(7299): p. 697-9.
43. Соколов, Д.И., *Децидуальные макрофаги: роль в иммунологическом диалоге матери и плода*. Иммунология, 2014. **35**(2): p. 113-117.
44. Houser, B.L., et al., *Two unique human decidual macrophage populations*. J Immunol, 2011. **186**(4): p. 2633-42.
45. McIntire, R.H., K.G. Ganacias, and J.S. Hunt, *Programming of human monocytes by the uteroplacental environment*. Reprod Sci, 2008. **15**(5): p. 437-47.
46. Gustafsson, C., et al., *Gene expression profiling of human decidual macrophages: evidence for immunosuppressive phenotype*. PLoS One, 2008. **3**(4): p. e2078.

47. Muramatsu, M., et al., *Vascular endothelial growth factor receptor-1 signaling promotes mobilization of macrophage lineage cells from bone marrow and stimulates solid tumor growth*. Cancer Res, 2010. **70**(20): p. 8211-21.
48. Trinchieri, G., et al., *Natural killer cell stimulatory factor (NKSF) or interleukin-12 is a key regulator of immune response and inflammation*. Prog Growth Factor Res, 1992. **4**(4): p. 355-68.
49. Gorvel, L., et al., *Myeloid decidual dendritic cells and immunoregulation of pregnancy: defective responsiveness to Coxiella burnetii and Brucella abortus*. Front Cell Infect Microbiol, 2014. **4**: p. 179.
50. Tirado-Gonzalez, I., et al., *Uterine NK cells are critical in shaping DC immunogenic functions compatible with pregnancy progression*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e46755.
51. van Kooyk, Y. and T.B. Geijtenbeek, *DC-SIGN: escape mechanism for pathogens*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(9): p. 697-709.
52. Kammerer, U., et al., *Human decidua contains potent immunostimulatory CD83(+) dendritic cells*. Am J Pathol, 2000. **157**(1): p. 159-69.
53. Sharma, M.D., et al., *Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase*. J Clin Invest, 2007. **117**(9): p. 2570-82.
54. Rieger, L., et al., *Antigen-presenting cells in human endometrium during the menstrual cycle compared to early pregnancy*. J Soc Gynecol Investig, 2004. **11**(7): p. 488-93.
55. Ristich, V., et al., *Tolerization of dendritic cells by HLA-G*. Eur J Immunol, 2005. **35**(4): p. 1133-42.
56. Zhou, L., M.M. Chong, and D.R. Littman, *Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation*. Immunity, 2009. **30**(5): p. 646-55.
57. Kaplan, M.H., *Th9 cells: differentiation and disease*. Immunol Rev, 2013. **252**(1): p. 104-15.
58. Crotty, S., *T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease*. Immunity, 2014. **41**(4): p. 529-42.
59. Phillips, T.A., J. Ni, and J.S. Hunt, *Cell-specific expression of B lymphocyte (APRIL, BLyS)- and Th2 (CD30L/CD153)-promoting tumor necrosis factor superfamily ligands in human placentas*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(1): p. 81-7.
60. Christiaens, I., et al., *Inflammatory processes in preterm and term parturition*. J Reprod Immunol, 2008. **79**(1): p. 50-7.
61. Christmas, S.E. and A. Meager, *Production of interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha by human T-cell clones expressing different forms of the gamma delta receptor*. Immunology, 1990. **71**(4): p. 486-92.
62. Christmas, S.E., et al., *T-cell receptor heterogeneity of gamma delta T-cell clones from human female reproductive tissues*. Immunology, 1993. **78**(3): p. 436-43.
63. van Kampen, C.A., et al., *Pregnancy can induce long-persisting primed CTLs specific for inherited paternal HLA antigens*. Hum Immunol, 2001. **62**(3): p. 201-7.
64. Aluvihare, V.R., M. Kallikourdis, and A.G. Betz, *Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus*. Nat Immunol, 2004. **5**(3): p. 266-71.
65. Shevach, E.M., *CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(6): p. 389-400.
66. Piccirillo, C.A. and E.M. Shevach, *Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells*. J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1137-40.
67. Lim, H.W., et al., *Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells*. J Immunol, 2005. **175**(7): p. 4180-3.
68. Ghiringhelli, F., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner*. J Exp Med, 2005. **202**(8): p. 1075-85.
69. Gorelik, L. and R.A. Flavell, *Transforming growth factor-beta in T-cell biology*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(1): p. 46-53.
70. Kallikourdis, M., et al., *Alloantigen-enhanced accumulation of CCR5+ 'effector' regulatory T cells in the gravid uterus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(2): p. 594-9.

71. Макаров О.В., К.Л.В., Ганковская Л.В., Бахарева И.В., Ганковская О.А., *Невынашивание беременности, инфекция, врожденный иммунитет*. Vol. 2000. 2007, Москва: "ГЭОТАР-Медиа". 176.
72. Grabstein, K.H., et al., *Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor*. Science, 1994. **264**(5161): p. 965-8.
73. Cavazzana-Calvo, M., et al., *Role of interleukin-2 (IL-2), IL-7, and IL-15 in natural killer cell differentiation from cord blood hematopoietic progenitor cells and from gamma c transduced severe combined immunodeficiency X1 bone marrow cells*. Blood, 1996. **88**(10): p. 3901-9.
74. Verma, S., et al., *Human decidual natural killer cells express the receptor for and respond to the cytokine interleukin 15*. Biol Reprod, 2000. **62**(4): p. 959-68.
75. Nishikawa, K., et al., *Accumulation of CD16-CD56+ natural killer cells with high affinity interleukin 2 receptors in human early pregnancy decidua*. Int Immunol, 1991. **3**(8): p. 743-50.
76. Kitaya, K., et al., *IL-15 expression at human endometrium and decidua*. Biol Reprod, 2000. **63**(3): p. 683-7.
77. Loke, Y.W., A. King, and T.D. Burrows, *Decidua in human implantation*. Hum Reprod, 1995. **10 Suppl 2**: p. 14-21.
78. Okada, H., et al., *Interleukin-1 inhibits interleukin-15 production by progesterone during in vitro decidualization in human*. J Reprod Immunol, 2004. **61**(1): p. 3-12.
79. Kokaji, A.I., D.L. Hockley, and K.P. Kane, *IL-15 transpresentation augments CD8+ T cell activation and is required for optimal recall responses by central memory CD8+ T cells*. J Immunol, 2008. **180**(7): p. 4391-401.
80. Carson, W.E., et al., *Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor*. J Exp Med, 1994. **180**(4): p. 1395-403.
81. Fehniger, T.A., et al., *Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response*. J Immunol, 1999. **162**(8): p. 4511-20.
82. Fehniger, T.A., W.E. Carson, and M.A. Caligiuri, *Costimulation of human natural killer cells is required for interferon gamma production*. Transplant Proc, 1999. **31**(3): p. 1476-8.
83. Bluman, E.M., et al., *Human natural killer cells produce abundant macrophage inflammatory protein-1 alpha in response to monocyte-derived cytokines*. J Clin Invest, 1996. **97**(12): p. 2722-7.
84. Fahey, T.J., 3rd, et al., *Macrophage inflammatory protein 1 modulates macrophage function*. J Immunol, 1992. **148**(9): p. 2764-9.
85. Eriksson, M., et al., *Unique phenotype of human uterine NK cells and their regulation by endogenous TGF-beta*. J Leukoc Biol, 2004. **76**(3): p. 667-75.
86. Sivori, S., et al., *NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells*. Eur J Immunol, 1999. **29**(5): p. 1656-66.
87. Mingari, M.C., et al., *Interleukin-15-induced maturation of human natural killer cells from early thymic precursors: selective expression of CD94/NKG2-A as the only HLA class I-specific inhibitory receptor*. Eur J Immunol, 1997. **27**(6): p. 1374-80.
88. Carson, W.E., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *CD56bright natural killer cell subsets: characterization of distinct functional responses to interleukin-2 and the c-kit ligand*. Eur J Immunol, 1997. **27**(2): p. 354-60.
89. Ashkar, A.A., et al., *Assessment of requirements for IL-15 and IFN regulatory factors in uterine NK cell differentiation and function during pregnancy*. J Immunol, 2003. **171**(6): p. 2937-44.
90. Torigoe, K., et al., *Purification and characterization of the human interleukin-18 receptor*. J Biol Chem, 1997. **272**(41): p. 25737-42.
91. Ostojic, S., et al., *Demonstration of the presence of IL-16, IL-17 and IL-18 at the murine fetomaternal interface during murine pregnancy*. Am J Reprod Immunol, 2003. **49**(2): p. 101-12.
92. Tokmadzic, V.S., et al., *IL-18 is present at the maternal-fetal interface and enhances cytotoxic activity of decidual lymphocytes*. Am J Reprod Immunol, 2002. **48**(4): p. 191-200.

93. Yoshimoto, T., et al., *Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon-gamma production from activated B cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(8): p. 3948-53.
94. Tominaga, K., et al., *IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1beta for IFN-gamma production from human T cells*. Int Immunol, 2000. **12**(2): p. 151-60.
95. Nakanishi, K., et al., *Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 423-74.
96. Tsutsui, H., et al., *IFN-gamma-inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones*. J Immunol, 1996. **157**(9): p. 3967-73.
97. Ida, A., et al., *IL-18 in pregnancy; the elevation of IL-18 in maternal peripheral blood during labour and complicated pregnancies*. J Reprod Immunol, 2000. **47**(1): p. 65-74.
98. Bennett, W.A., et al., *Expression and production of interleukin-10 by human trophoblast: relationship to pregnancy immunotolerance*. Early Pregnancy, 1997. **3**(3): p. 190-8.
99. Ekerfelt, C., et al., *Spontaneous secretion of interleukin-4, interleukin-10 and interferon-gamma by first trimester decidual mononuclear cells*. Am J Reprod Immunol, 2002. **47**(3): p. 159-66.
100. Lidstrom, C., et al., *Cytokine secretion patterns of NK cells and macrophages in early human pregnancy decidua and blood: implications for suppressor macrophages in decidua*. Am J Reprod Immunol, 2003. **50**(6): p. 444-52.
101. Roth, I. and S.J. Fisher, *IL-10 is an autocrine inhibitor of human placental cytotrophoblast MMP-9 production and invasion*. Dev Biol, 1999. **205**(1): p. 194-204.
102. Moreau, P., et al., *IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes*. Int Immunol, 1999. **11**(5): p. 803-11.
103. Murphy, S.P., et al., *Interferon gamma in successful pregnancies*. Biol Reprod, 2009. **80**(5): p. 848-59.
104. Cholujo, D., et al., *Comparative study of four fluorescent probes for evaluation of natural killer cell cytotoxicity assays*. Immunobiology, 2008. **213**(8): p. 629-40.
105. Godoy-Ramirez, K., K. Franck, and H. Gaines, *A novel method for the simultaneous assessment of natural killer cell conjugate formation and cytotoxicity at the single-cell level by multi-parameter flow cytometry*. J Immunol Methods, 2000. **239**(1-2): p. 35-44.
106. Murphy, K., Weaver, C, *Janeway's Immunology*. 2017: Garland Science, Taylor & Francis Group.
107. А.А., Я., *Иммунология*. 2010: ГЭОТАР-Медиа.
108. Montaldo, E., et al., *Human NK cell receptors/markers: a tool to analyze NK cell development, subsets and function*. Cytometry A, 2013. **83**(8): p. 702-13.
109. Chan, A., et al., *CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts*. J Immunol, 2007. **179**(1): p. 89-94.
110. Lanier, L.L., et al., *Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56)*. J Immunol, 1991. **146**(12): p. 4421-6.
111. Minami, Y., et al., *The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes*. Annu Rev Immunol, 1993. **11**: p. 245-68.
112. Caligiuri, M.A., et al., *Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors*. J Exp Med, 1990. **171**(5): p. 1509-26.
113. Nagler, A., L.L. Lanier, and J.H. Phillips, *Constitutive expression of high affinity interleukin 2 receptors on human CD16-natural killer cells in vivo*. J Exp Med, 1990. **171**(5): p. 1527-33.
114. Voss, S.D., P.M. Sondel, and R.J. Robb, *Characterization of the interleukin 2 receptors (IL-2R) expressed on human natural killer cells activated in vivo by IL-2: association of the p64 IL-2R gamma chain with the IL-2R beta chain in functional intermediate-affinity IL-2R*. J Exp Med, 1992. **176**(2): p. 531-41.
115. Ross, G.D. and V. Vetvicka, *CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions*. Clin Exp Immunol, 1993. **92**(2): p. 181-4.
116. Hart, M.K., et al., *Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) and natural killer (NK) cell activity: LFA-1 is not necessary for all killer: target cell interactions*. Cell Immunol, 1987. **109**(2): p. 306-17.

117. Barber, D.F., M. Faure, and E.O. Long, *LFA-1 contributes an early signal for NK cell cytotoxicity*. J Immunol, 2004. **173**(6): p. 3653-9.
118. Sedlmayr, P., et al., *Differential phenotypic properties of human peripheral blood CD56dim+ and CD56bright+ natural killer cell subpopulations*. Int Arch Allergy Immunol, 1996. **110**(4): p. 308-13.
119. Lima, M., et al., *Immunophenotypic characterization of normal blood CD56+lo versus CD56+hi NK-cell subsets and its impact on the understanding of their tissue distribution and functional properties*. Blood Cells Mol Dis, 2001. **27**(4): p. 731-43.
120. von Andrian, U.H. and C.R. Mackay, *T-cell function and migration. Two sides of the same coin*. N Engl J Med, 2000. **343**(14): p. 1020-34.
121. Springer, T.A., *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm*. Cell, 1994. **76**(2): p. 301-14.
122. Sugimori, T., D.L. Griffith, and M.A. Arnaout, *Emerging paradigms of integrin ligand binding and activation*. Kidney Int, 1997. **51**(5): p. 1454-62.
123. Ilveskoski, I., et al., *Neuropsychologic late effects in children with malignant brain tumors treated with surgery, radiotherapy and "8 in 1" chemotherapy*. Neuropediatrics, 1996. **27**(3): p. 124-9.
124. Bevilacqua, M.P., *Endothelial-leukocyte adhesion molecules*. Annu Rev Immunol, 1993. **11**: p. 767-804.
125. Frey, M., et al., *Differential expression and function of L-selectin on CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets*. J Immunol, 1998. **161**(1): p. 400-8.
126. Fehniger TA, C.M., Nuovo GJ, et al., *CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity*. Blood. 2003; 101: 3052-3057, 2003.
127. Hwang, S.T., et al., *GlyCAM-1, a physiologic ligand for L-selectin, activates beta 2 integrins on naive peripheral lymphocytes*. J Exp Med, 1996. **184**(4): p. 1343-8.
128. Brenchley, J.M., et al., *Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells*. Blood, 2003. **101**(7): p. 2711-20.
129. Lopez-Verges, S., et al., *CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset*. Blood, 2010. **116**(19): p. 3865-74.
130. Ditlevsen, D.K. and K. Kolkova, *Signaling pathways involved in NCAM-induced neurite outgrowth*. Adv Exp Med Biol, 2010. **663**: p. 151-68.
131. Kelly-Rogers, J., et al., *Activation-induced expression of CD56 by T cells is associated with a reprogramming of cytolytic activity and cytokine secretion profile in vitro*. Hum Immunol, 2006. **67**(11): p. 863-73.
132. Atkins, A.R., et al., *Solution structure of the third immunoglobulin domain of the neural cell adhesion molecule N-CAM: can solution studies define the mechanism of homophilic binding?* J Mol Biol, 2001. **311**(1): p. 161-72.
133. Garni-Wagner, B.A., et al., *A novel function-associated molecule related to non-MHC-restricted cytotoxicity mediated by activated natural killer cells and T cells*. J Immunol, 1993. **151**(1): p. 60-70.
134. Davis, S.J. and P.A. van der Merwe, *The structure and ligand interactions of CD2: implications for T-cell function*. Immunol Today, 1996. **17**(4): p. 177-87.
135. Tangye, S.G., J.H. Phillips, and L.L. Lanier, *The CD2-subset of the Ig superfamily of cell surface molecules: receptor-ligand pairs expressed by NK cells and other immune cells*. Semin Immunol, 2000. **12**(2): p. 149-57.
136. Schuhmachers, G., et al., *Activation of murine epidermal gamma delta T cells through surface 2B4*. Eur J Immunol, 1995. **25**(4): p. 1117-20.
137. Veillette, A. and S. Latour, *The SLAM family of immune-cell receptors*. Curr Opin Immunol, 2003. **15**(3): p. 277-85.
138. Ostrakhovitch, E.A. and S.S. Li, *The role of SLAM family receptors in immune cell signaling*. Biochem Cell Biol, 2006. **84**(6): p. 832-43.
139. Flaig, R.M., S. Stark, and C. Watzl, *Cutting edge: NTB-A activates NK cells via homophilic interaction*. J Immunol, 2004. **172**(11): p. 6524-7.

140. Falco, M., et al., *Homophilic interaction of NTBA, a member of the CD2 molecular family: induction of cytotoxicity and cytokine release in human NK cells*. Eur J Immunol, 2004. **34**(6): p. 1663-72.
141. Kumaresan, P.R., et al., *CS1, a novel member of the CD2 family, is homophilic and regulates NK cell function*. Mol Immunol, 2002. **39**(1-2): p. 1-8.
142. Brown, M.H., et al., *2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48*. J Exp Med, 1998. **188**(11): p. 2083-90.
143. Assarsson, E., et al., *2B4 co-stimulation: NK cells and their control of adaptive immune responses*. Mol Immunol, 2005. **42**(4): p. 419-23.
144. McNerney, M.E., K.M. Lee, and V. Kumar, *2B4 (CD244) is a non-MHC binding receptor with multiple functions on natural killer cells and CD8+ T cells*. Mol Immunol, 2005. **42**(4): p. 489-94.
145. Boles, K.S., et al., *2B4 (CD244) and CS1: novel members of the CD2 subset of the immunoglobulin superfamily molecules expressed on natural killer cells and other leukocytes*. Immunol Rev, 2001. **181**: p. 234-49.
146. Lee, K.M., et al., *Requirement of homotypic NK-cell interactions through 2B4(CD244)/CD48 in the generation of NK effector functions*. Blood, 2006. **107**(8): p. 3181-8.
147. Assarsson, E., et al., *NK cells stimulate proliferation of T and NK cells through 2B4/CD48 interactions*. J Immunol, 2004. **173**(1): p. 174-80.
148. Stark, S. and C. Watzl, *2B4 (CD244), NTB-A and CRACC (CS1) stimulate cytotoxicity but no proliferation in human NK cells*. Int Immunol, 2006. **18**(2): p. 241-7.
149. Adib-Conquy, M., et al., *TLR-mediated activation of NK cells and their role in bacterial/viral immune responses in mammals*. Immunology and Cell Biology, 2014. **92**(3): p. 256-262.
150. Moretta, L., et al., *Human natural killer cells: Molecular mechanisms controlling NK cell activation and tumor cell lysis*. Immunol Lett, 2005. **100**(1): p. 7-13.
151. Agrawal, S., et al., *Cutting edge: MHC class I triggering by a novel cell surface ligand costimulates proliferation of activated human T cells*. J Immunol, 1999. **162**(3): p. 1223-6.
152. Diefenbach, A., et al., *Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D*. Nat Immunol, 2002. **3**(12): p. 1142-9.
153. Bauer, S., et al., *Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA*. Science, 1999. **285**(5428): p. 727-9.
154. Cosman, D., et al., *ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor*. Immunity, 2001. **14**(2): p. 123-33.
155. Fuchs, A., et al., *Paradoxical inhibition of human natural interferon-producing cells by the activating receptor NKp44*. Blood, 2005. **106**(6): p. 2076-82.
156. Pende, D., et al., *Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells*. J Exp Med, 1999. **190**(10): p. 1505-16.
157. Moretta, A., *Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(12): p. 957-64.
158. Colonna, M., et al., *A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells*. J Exp Med, 1997. **186**(11): p. 1809-18.
159. Morel, E. and T. Bellon, *HLA class I molecules regulate IFN-gamma production induced in NK cells by target cells, viral products, or immature dendritic cells through the inhibitory receptor ILT2/CD85j*. J Immunol, 2008. **181**(4): p. 2368-81.
160. LeMaoult, J., et al., *HLA-G up-regulates ILT2, ILT3, ILT4, and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells*. FASEB J, 2005. **19**(6): p. 662-4.
161. Liang, S., et al., *Modulation of dendritic cell differentiation by HLA-G and ILT4 requires the IL-6--STAT3 signaling pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(24): p. 8357-62.
162. Chapman, T.L., A.P. Heikeman, and P.J. Bjorkman, *The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18*. Immunity, 1999. **11**(5): p. 603-13.
163. Lanier, L.L., *NK cell recognition*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 225-74.

164. Mathew, S.O., et al., *Functional role of human NK cell receptor 2B4 (CD244) isoforms*. Eur J Immunol, 2009. **39**(6): p. 1632-41.
165. Naruse, K., et al., *The urokinase plasminogen activator (uPA) system in uterine natural killer cells in the placental bed during early pregnancy*. Placenta, 2009. **30**(5): p. 398-404.
166. Naruse, K., et al., *Localization of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 and tissue inhibitors for MMPs (TIMPs) in uterine natural killer cells in early human pregnancy*. Hum Reprod, 2009. **24**(3): p. 553-61.
167. Chaouat, G., *Current knowledge on natural killer cells, pregnancy and pre-eclampsia. Introduction*. Reprod Biomed Online, 2008. **16**(2): p. 170-2.
168. Higuma-Myojo, S., et al., *Cytokine profile of natural killer cells in early human pregnancy*. Am J Reprod Immunol, 2005. **54**(1): p. 21-9.
169. Dosiou, C. and L.C. Giudice, *Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives*. Endocr Rev, 2005. **26**(1): p. 44-62.
170. Slukvin, II, E.E. Breburda, and T.G. Golos, *Dynamic changes in primate endometrial leukocyte populations: differential distribution of macrophages and natural killer cells at the rhesus monkey implantation site and in early pregnancy*. Placenta, 2004. **25**(4): p. 297-307.
171. Miller, J.S., *The biology of natural killer cells in cancer, infection, and pregnancy*. Exp Hematol, 2001. **29**(10): p. 1157-68.
172. Ashkar, A.A. and B.A. Croy, *Functions of uterine natural killer cells are mediated by interferon gamma production during murine pregnancy*. Semin Immunol, 2001. **13**(4): p. 235-41.
173. Smyth, M.J., et al., *Activation of NK cell cytotoxicity*. Mol Immunol, 2005. **42**(4): p. 501-10.
174. Bhat, R. and C. Watzl, *Serial killing of tumor cells by human natural killer cells--enhancement by therapeutic antibodies*. PLoS One, 2007. **2**(3): p. e326.
175. Topham, N.J. and E.W. Hewitt, *Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger?* Immunology, 2009. **128**(1): p. 7-15.
176. Cullen, S.P. and S.J. Martin, *Mechanisms of granule-dependent killing*. Cell Death Differ, 2008. **15**(2): p. 251-62.
177. Мүрүгин В.В., *Комплекс методов исследования НК-клеток в норме и при патологии*.
178. Degli-Esposti, M., *To die or not to die--the quest of the TRAIL receptors*. J Leukoc Biol, 1999. **65**(5): p. 535-42.
179. Screpanti, V., et al., *A central role for death receptor-mediated apoptosis in the rejection of tumors by NK cells*. J Immunol, 2001. **167**(4): p. 2068-73.
180. Takeda, K., et al., *Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells*. Nat Med, 2001. **7**(1): p. 94-100.
181. Yokoyama, W.M., S. Kim, and A.R. French, *The dynamic life of natural killer cells*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 405-29.
182. Miller, J.S., C. Verfaillie, and P. McGlave, *The generation of human natural killer cells from CD34+/DR- primitive progenitors in long-term bone marrow culture*. Blood, 1992. **80**(9): p. 2182-7.
183. Yu, H., et al., *Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34(+) human natural killer cell progenitor that responds to interleukin-15*. Blood, 1998. **92**(10): p. 3647-57.
184. Sanchez, M.J., et al., *Identification of a common T/natural killer cell progenitor in human fetal thymus*. J Exp Med, 1994. **180**(2): p. 569-76.
185. Freud, A.G., et al., *A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells*. Immunity, 2005. **22**(3): p. 295-304.
186. Imada, K., et al., *Stat5b is essential for natural killer cell-mediated proliferation and cytolytic activity*. J Exp Med, 1998. **188**(11): p. 2067-74.
187. Fehniger, T.A., et al., *CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity*. Blood, 2003. **101**(8): p. 3052-7.
188. Geiger, T.L. and J.C. Sun, *Development and maturation of natural killer cells*. Curr Opin Immunol, 2016. **39**: p. 82-9.

189. Freud, A.G., et al., *Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo*. J Exp Med, 2006. **203**(4): p. 1033-43.
190. Grzywacz, B., et al., *Coordinated acquisition of inhibitory and activating receptors and functional properties by developing human natural killer cells*. Blood, 2006. **108**(12): p. 3824-33.
191. Perez-Martinez, A., et al., *Blood dendritic cells suppress NK cell function and increase the risk of leukemia relapse after hematopoietic cell transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2011. **17**(5): p. 598-607.
192. Yu, J.H., A.G. Freud, and M.A. Caligiuri, *Location and cellular stages of natural killer cell development*. Trends in Immunology, 2013. **34**(12): p. 573-582.
193. Moretta, L., *Dissecting CD56dim human NK cells*. Blood, 2010. **116**(19): p. 3689-91.
194. Caligiuri, M.A., *Human natural killer cells*. Blood, 2008. **112**(3): p. 461-9.
195. Lonnemann, G., *Impaired NK cell function in ESRD patients*. Blood Purif, 2008. **26**(4): p. 315-6.
196. Majumder, B., et al., *Infection with Vpr-positive human immunodeficiency virus type 1 impairs NK cell function indirectly through cytokine dysregulation of infected target cells*. J Virol, 2008. **82**(14): p. 7189-200.
197. MacFarlane, A.W.t., et al., *Enhanced NK-cell development and function in BCAP-deficient mice*. Blood, 2008. **112**(1): p. 131-40.
198. Ferlazzo, G., et al., *Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the Nkp30 receptor by activated NK cells*. J Exp Med, 2002. **195**(3): p. 343-51.
199. De Maria, A. and L. Moretta, *NK cell function in HIV-1 infection*. Curr HIV Res, 2008. **6**(5): p. 433-40.
200. Lin, A., et al., *HLA-G expression in human ovarian carcinoma counteracts NK cell function*. Ann Oncol, 2007. **18**(11): p. 1804-9.
201. Ostberg, J.R., et al., *Enhancement of natural killer (NK) cell cytotoxicity by fever-range thermal stress is dependent on NKG2D function and is associated with plasma membrane NKG2D clustering and increased expression of MICA on target cells*. J Leukoc Biol, 2007. **82**(5): p. 1322-31.
202. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets*. Trends Immunol, 2001. **22**(11): p. 633-40.
203. Cooper, M.A., et al., *Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset*. Blood, 2001. **97**(10): p. 3146-51.
204. Ferlazzo, G., et al., *The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic*. J Immunol, 2004. **172**(3): p. 1455-62.
205. Ye, Z.Y., et al., *Primary Esophageal Extranodal NK/T Cell Lymphoma With Biphasic Morphology: A Case Report and Literature Review*. Medicine (Baltimore), 2015. **94**(28): p. e1151.
206. Alhumidi, A., *Cutaneous Intravascular NK/T-cell lymphoma mimic panniculitis clinically, case report and literature brief review*. Diagn Pathol, 2015. **10**: p. 107.
207. Manaster, I., et al., *Endometrial NK cells are special immature cells that await pregnancy*. J Immunol, 2008. **181**(3): p. 1869-76.
208. Searle, R.F., R.K. Jones, and J.N. Bulmer, *Phenotypic analysis and proliferative responses of human endometrial granulated lymphocytes during the menstrual cycle*. Biol Reprod, 1999. **60**(4): p. 871-8.
209. Ho, H.N., et al., *Activation status of T and NK cells in the endometrium throughout menstrual cycle and normal and abnormal early pregnancy*. Hum Immunol, 1996. **49**(2): p. 130-6.
210. Jones, R.K., J.N. Bulmer, and R.F. Searle, *Cytotoxic activity of endometrial granulated lymphocytes during the menstrual cycle in humans*. Biol Reprod, 1997. **57**(5): p. 1217-22.
211. Kalkunte, S.S., et al., *Vascular endothelial growth factor C facilitates immune tolerance and endovascular activity of human uterine NK cells at the maternal-fetal interface*. J Immunol, 2009. **182**(7): p. 4085-92.
212. Tabiasco, J., et al., *Human decidual NK cells: unique phenotype and functional properties -- a review*. Placenta, 2006. **27 Suppl A**: p. S34-9.

213. Manaster, I. and O. Mandelboim, *The unique properties of uterine NK cells*. Am J Reprod Immunol, 2010. **63**(6): p. 434-44.
214. Mallidi, T.V., et al., *Murine endometrial and decidual NK1.1+ natural killer cells display a B220+CD11c+ cell surface phenotype*. Biol Reprod, 2009. **81**(2): p. 310-8.
215. Matsuura-Sawada, R., et al., *Reproduction of menstrual changes in transplanted human endometrial tissue in immunodeficient mice*. Hum Reprod, 2005. **20**(6): p. 1477-84.
216. Hanna, J., et al., *CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD16- human natural killer cells*. Blood, 2003. **102**(5): p. 1569-77.
217. Keskin, D.B., et al., *TGFbeta promotes conversion of CD16+ peripheral blood NK cells into CD16- NK cells with similarities to decidual NK cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(9): p. 3378-83.
218. Yamaguchi, T., et al., *Potential selectin L ligands involved in selective recruitment of peripheral blood CD16(-) natural killer cells into human endometrium*. Biol Reprod, 2006. **74**(1): p. 35-40.
219. Wu, X., et al., *Human first-trimester trophoblast cells recruit CD56brightCD16- NK cells into decidua by way of expressing and secreting of CXCL12/stromal cell-derived factor 1*. J Immunol, 2005. **175**(1): p. 61-8.
220. Lockwood, C.J., et al., *Decidual cell regulation of natural killer cell-recruiting chemokines: implications for the pathogenesis and prediction of preeclampsia*. Am J Pathol, 2013. **183**(3): p. 841-56.
221. Carlino, C., et al., *Recruitment of circulating NK cells through decidual tissues: a possible mechanism controlling NK cell accumulation in the uterus during early pregnancy*. Blood, 2008. **111**(6): p. 3108-15.
222. Koopman, L.A., et al., *Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential*. J Exp Med, 2003. **198**(8): p. 1201-12.
223. Dunn, C.L., H.O. Critchley, and R.W. Kelly, *IL-15 regulation in human endometrial stromal cells*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(4): p. 1898-901.
224. Pugh, C.W. and P.J. Ratcliffe, *Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 677-84.
225. Cerdeira, A.S., et al., *Conversion of peripheral blood NK cells to a decidual NK-like phenotype by a cocktail of defined factors*. J Immunol, 2013. **190**(8): p. 3939-48.
226. Соколова Ю.В., Б.Л.Н., Бесмельцев С.С., *СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИИ ИММУНОГЛОБУЛИНПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ КИЛЛЕРНЫХ КЛЕТОК В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ*. ГЕМАТОЛОГИЯ, 2010. **11**.
227. Bi, Y., et al., *Intravascular NK-cell lymphoma: a case report and review of the literature*. Diagn Pathol, 2015. **10**: p. 84.
228. Li, X., et al., *NK/T cell lymphoma involving mediastinum: report of a case and review of literature*. Int J Clin Exp Pathol, 2014. **7**(9): p. 6399-402.
229. Jain, S., et al., *Precursor NK cell lymphoblastic leukemia/lymphoma-report of a case with literature review*. Indian J Hematol Blood Transfus, 2014. **30**(Suppl 1): p. 283-5.
230. Cao, Q., et al., *Primary spleen extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type, with bone marrow involvement and CD30 positive expression: a case report and literature review*. Diagn Pathol, 2014. **9**: p. 169.
231. Gui, W., et al., *Successful treatment with L-asparaginase based regimen for primary pulmonary NK/T cell lymphoma: a case report and review of the literature*. Clin Respir J, 2014.
232. Peng, H. and Z. Tian, *NK cell trafficking in health and autoimmunity: a comprehensive review*. Clin Rev Allergy Immunol, 2014. **47**(2): p. 119-27.
233. Maltez, V.I., et al., *Inflammasomes Coordinate Pyroptosis and Natural Killer Cell Cytotoxicity to Clear Infection by a Ubiquitous Environmental Bacterium*. Immunity, 2015. **43**(5): p. 987-97.
234. Shimizu, I., et al., *Neurolymphomatosis in a patient with extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal-type: a case report and literature review*. Intern Med, 2014. **53**(5): p. 471-5.
235. Rajagopalan, S., *HLA-G-mediated NK cell senescence promotes vascular remodeling: implications for reproduction*. Cell Mol Immunol, 2014. **11**(5): p. 460-6.
236. Rajagopalan, S., *Endosomal signaling and a novel pathway defined by the natural killer receptor KIR2DL4 (CD158d)*. Traffic, 2010. **11**(11): p. 1381-90.

237. Robson, A., et al., *Uterine natural killer cells initiate spiral artery remodeling in human pregnancy*. FASEB J, 2012. **26**(12): p. 4876-85.
238. Vacca, P., et al., *Analysis of natural killer cells isolated from human decidua: Evidence that 2B4 (CD244) functions as an inhibitory receptor and blocks NK-cell function*. Blood, 2006. **108**(13): p. 4078-85.
239. Wallace, A.E., R. Fraser, and J.E. Cartwright, *Extravillous trophoblast and decidual natural killer cells: a remodelling partnership*. Hum Reprod Update, 2012. **18**(4): p. 458-71.
240. Roberts, R.M., et al., *Differentiation of trophoblast cells from human embryonic stem cells: to be or not to be?* Reproduction, 2014. **147**(5): p. D1-12.
241. Apps, R., et al., *Human leucocyte antigen (HLA) expression of primary trophoblast cells and placental cell lines, determined using single antigen beads to characterize allotype specificities of anti-HLA antibodies*. Immunology, 2009. **127**(1): p. 26-39.
242. Senner, C.E. and M. Hemberger, *Regulation of early trophoblast differentiation - lessons from the mouse*. Placenta, 2010. **31**(11): p. 944-50.
243. Noguer-Dance, M., et al., *The primate-specific microRNA gene cluster (C19MC) is imprinted in the placenta*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(18): p. 3566-82.
244. Wegmann, T.G., et al., *Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon?* Immunol Today, 1993. **14**(7): p. 353-6.
245. Kanellopoulos-Langevin, C., et al., *Tolerance of the fetus by the maternal immune system: role of inflammatory mediators at the feto-maternal interface*. Reprod Biol Endocrinol, 2003. **1**: p. 121.
246. Moreau, P., et al., *Molecular and immunologic aspects of the nonclassical HLA class I antigen HLA-G: evidence for an important role in the maternal tolerance of the fetal allograft*. Am J Reprod Immunol, 1998. **40**(3): p. 136-44.
247. Senturk, L.M. and A. Arici, *Leukemia inhibitory factor in human reproduction*. Am J Reprod Immunol, 1998. **39**(2): p. 144-51.
248. Zorzi, W., et al., *Demonstration of the expression of CD95 ligand transcript and protein in human placenta*. Placenta, 1998. **19**(4): p. 269-77.
249. Aarli, A. and R. Matre, *Suppression of immunoglobulin secretion by soluble annexin II*. Scand J Immunol, 1998. **48**(5): p. 522-6.
250. Holmes, C.H., et al., *Preferential expression of the complement regulatory protein decay accelerating factor at the fetomaternal interface during human pregnancy*. J Immunol, 1990. **144**(8): p. 3099-105.
251. Scott, M.D. and K.L. Murad, *Cellular camouflage: fooling the immune system with polymers*. Curr Pharm Des, 1998. **4**(6): p. 423-38.
252. Bonagura, V.R., et al., *Anti-clonotypic autoantibodies in pregnancy*. Cell Immunol, 1987. **108**(2): p. 356-65.
253. King, A., C. Birkby, and Y.W. Loke, *Early human decidual cells exhibit NK activity against the K562 cell line but not against first trimester trophoblast*. Cell Immunol, 1989. **118**(2): p. 337-44.
254. King, A., P. Kalra, and Y.W. Loke, *Human trophoblast cell resistance to decidual NK lysis is due to lack of NK target structure*. Cell Immunol, 1990. **127**(2): p. 230-7.
255. Avril, T., et al., *Trophoblast cell line resistance to NK lysis mainly involves an HLA class I-independent mechanism*. J Immunol, 1999. **162**(10): p. 5902-9.
256. King, A., et al., *Recognition of trophoblast HLA class I molecules by decidual NK cell receptors--a review*. Placenta, 2000. **21 Suppl A**: p. S81-5.
257. Chen, L.J., et al., *Inhibition of HLA-G expression via RNAi abolishes resistance of extravillous trophoblast cell line TEV-1 to NK lysis*. Placenta, 2010. **31**(6): p. 519-27.
258. Moffett, A., L. Regan, and P. Braude, *Natural killer cells, miscarriage, and infertility*. BMJ, 2004. **329**(7477): p. 1283-5.
259. Jabrane-Ferrat, N. and J. Siewiera, *The up side of decidual natural killer cells: new developments in immunology of pregnancy*. Immunology, 2014. **141**(4): p. 490-7.
260. Coyle, C., et al., *Ovine trophoblasts express cathelicidin host defence peptide in response to infection*. J Reprod Immunol, 2016. **117**: p. 10-6.

261. Abrahams, V.M., et al., *First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis*. Mol Hum Reprod, 2004. **10**(1): p. 55-63.
262. Kohler, P.O. and W.E. Bridson, *Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma*. J Clin Endocrinol Metab, 1971. **32**(5): p. 683-7.
263. Gong, J.H., G. Maki, and H.G. Klingemann, *Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells*. Leukemia, 1994. **8**(4): p. 652-8.
264. Komatsu, F. and M. Kajiwara, *Relation of natural killer cell line NK-92-mediated cytotoxicity (NK-92-lysis) with the surface markers of major histocompatibility complex class I antigens, adhesion molecules, and Fas of target cells*. Oncol Res, 1998. **10**(10): p. 483-9.
265. Соколов Д.И., С.С.А., *Иммунологический контроль формирования сосудистой сети плаценты*. 2012: ООО "Издательство Н-Л".
266. Ailamazian, E.K., et al., *[Cells of immune system of mother and trophoblast cells: constructive cooperation for the sake of achievement of the joint purpose]*. Vestn Ross Akad Med Nauk, 2013(11): p. 12-21.
267. Айламазян Э.К., С.О.И., Сельков С.А., Соколов Д.И., *КЛЕТКИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ МАТЕРИ И КЛЕТКИ ТРОФОБЛАСТА: «КОНСТРУКТИВНОЕ СОТРУДНИЧЕСТВО» РАДИ ДОСТИЖЕНИЯ СОВМЕСТНОЙ ЦЕЛИ*. Вестник Российской академии медицинских наук, 2013. **68**(11): p. 12-21.
268. Fauriat, C., et al., *Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition*. Blood, 2010. **115**(11): p. 2167-76.
269. Cooper, M.A., et al., *Interleukin-1beta costimulates interferon-gamma production by human natural killer cells*. Eur J Immunol, 2001. **31**(3): p. 792-801.
270. Nilkaeo, A. and S. Bhuvanath, *Interleukin-1 modulation of human placental trophoblast proliferation*. Mediators Inflamm, 2006. **2006**(2): p. 79359.
271. Kang, Y.J., et al., *An increased level of IL-6 suppresses NK cell activity in peritoneal fluid of patients with endometriosis via regulation of SHP-2 expression*. Hum Reprod, 2014. **29**(10): p. 2176-89.
272. Saito, S., et al., *Interleukin-8 production by CD16-CD56bright natural killer cells in the human early pregnancy decidua*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **200**(1): p. 378-83.
273. Kubista, B., et al., *Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on natural-killer cell mediated cytotoxicity*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(7): p. 1056-60.
274. Stewart-Akers, A.M., et al., *Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on lymphokine-activated killer cell induction*. Blood, 1993. **81**(10): p. 2671-8.
275. Kuniwa, T., et al., *NK cells activated by Interleukin-4 in cooperation with Interleukin-15 exhibit distinctive characteristics*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(36): p. 10139-44.
276. Bruno, A., et al., *The proangiogenic phenotype of natural killer cells in patients with non-small cell lung cancer*. Neoplasia, 2013. **15**(2): p. 133-42.
277. Fuchinoe, K., et al., *Expression of retinoid-related orphan receptor (ROR)gamma on NK22 cells in the peripheral blood and uterine endometrium of women with unexplained recurrent pregnancy loss and unexplained infertility*. J Obstet Gynaecol Res, 2016. **42**(11): p. 1541-1552.
278. Hidaka, Y., et al., *Changes in natural killer cell activity in normal pregnant and postpartum women: increases in the first trimester and postpartum period and decrease in late pregnancy*. J Reprod Immunol, 1991. **20**(1): p. 73-83.
279. Ghosh, D., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and placental growth factor (PlGF) in conceptus and endometrium during implantation in the rhesus monkey*. Mol Hum Reprod, 2000. **6**(10): p. 935-41.
280. Thiruchelvam, U., M. Wingfield, and C. O'Farrelly, *Natural Killer Cells: Key Players in Endometriosis*. Am J Reprod Immunol, 2015. **74**(4): p. 291-301.
281. Cerwenka, A. and L.L. Lanier, *Natural killer cell memory in infection, inflammation and cancer*. Nat Rev Immunol, 2016. **16**(2): p. 112-23.
282. O'Leary, J.G., et al., *T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells*. Nat Immunol, 2006. **7**(5): p. 507-16.

- 283. Paust, S., et al., *Critical role for the chemokine receptor CXCR6 in NK cell-mediated antigen-specific memory of haptens and viruses*. Nat Immunol, 2010. **11**(12): p. 1127-35.
- 284. Reeves, R.K., et al., *Antigen-specific NK cell memory in rhesus macaques*. Nat Immunol, 2015. **16**(9): p. 927-32.
- 285. Lissauer, D., et al., *Fetal-specific CD8+ cytotoxic T cell responses develop during normal human pregnancy and exhibit broad functional capacity*. J Immunol, 2012. **189**(2): p. 1072-80.

